

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**SUPERENROLLAMIENTO, ENCADENAMIENTO Y
ANUDAMIENTO DEL DNA
EN PROCARIOTAS Y EUCARIOTAS**

Memoria presentada por Jorge Cebrián Castillo,
licenciado en Biología, para optar al grado de Doctor

Director de Tesis:

Dr. Jorge Bernardo Schvartzman Blinder

Departamento de Biología Celular y Molecular
Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC)

Madrid, 2015



La presente Tesis Doctoral titulada “Superenrollamiento, encadenamiento y anudamiento del DNA en procariotas y eucariotas” ha sido realizada por Jorge Cebrián Castillo, bajo la dirección del Dr. Jorge Bernardo Schwartzman Blinder, en el Departamento de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) de Madrid, con la financiación concedida por el Ministerio de Economía y Competitividad a través del Proyecto BFU2011-22489.

Opta al grado de Doctor

Jorge Cebrián Castillo

Vº Bº del Director de la Tesis

Vº Bº del Tutor de la Tesis

Dr. Jorge Bernardo Schwartzman Blinder

Dr. Francisco Portillo Pérez

A mis padres
A mis hermanos
A Pin

Agradecimientos

Una Tesis Doctoral es trabajo y tiempo pero, sin duda, se compone de muchas personas. Por ello, quiero agradecer y recordar a todas las personas que me han acompañado durante esta gran etapa.

En primer lugar quiero dar las gracias al Dr. Bernardo Schwartzman por darme la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral en su laboratorio. Gracias por tu cercanía, guiarme en el trabajo y estar siempre dispuesto a resolver cualquier duda. Gracias a la Dra. Débora Krimer y al Dr. Pablo Hernández por su interés, cooperación y buenos consejos que han permitido que mi trabajo sea mejor.

Gracias a Marisa “una de las más expertas en bidimensionales del mundo”, me dijeron mi primer día. No se equivocaban. Gracias por dejarme trabajar a tu lado. Cuando tuviste tus merecidas “vacaciones”, seguiste ayudándome en tu “oficina”, por tfo., email y whatsapp. Esta es tu última tesis y has sido la mejor maestra que se puede tener. Gracias por tus ánimos, generosidad y paciencia.

A todos mis compañeros del laboratorio y del CIB, que he tenido la gran suerte de conocer y he pasado muchos y grandes momentos. Gracias, María, mi primer mes aquí empecé siguiendo tus experimentos y me contagiaste tu pasión por la ciencia y tu constante optimismo. Estefanía, gracias por introducirme en el mundo de las levaduras. Siendo de Zaragoza, maja tenías que ser. Gracias Vanessa, por tu ayuda con las PCRs. Con tu paciencia y tesón sacarás adelante cualquier trabajo. Ali, gracias porque he aprendido mucho contigo y de ti. El lab se queda en buenas manos. Gracias a Leo y Javi. Leo, eres de las mejores personas que conozco, además te ríes de mis gracias. Javi, eres el más noble aunque te guste picarme. Gracias Eva, porque desprendes entusiasmo y tranquilidad. Gracias Cris, no es que te quiera copiar, pero es que eres de lo mejor que me llevo del CIB. Marta, aunque no he coincidido contigo en el CIB, es como si lo hubiera hecho. Gracias por tu cariño, tú sí eres un sol. Y no quiero olvidarme de Joca, Bea y Gonzalo, gracias chicos.

Gracias a nuestros visitantes, José, Víctor y Cristina por enseñarme tanto de Paraguay.

Quiero agradecer también a todas las personas que me han facilitado el trabajo en la parte de microscopía. En el CIB, a Jörg por su buena disposición a la hora de prestarme el AFM y a Virginia por venir a enseñarme su manejo. En el CNB, a Fernando y Maru porque, aunque fueron estancias breves, aprendí mucho y me ayudasteis en todo lo que pudisteis. En el CBMSO, a Maite y Milagros por su entusiasmo, amabilidad y cercanía para trabajar con el electrónico.

Gracias, cómo no, a mis amigos de Zaragoza: Alfredo, Ali, Alonso, Calde, Dani, Gonzalo, Jesús, Jofre, Laura, María, Mónica, Nacho, Nati, y Sara. Con el tiempo algunos me seguisteis en esta aventura de venir a Madrid, pero todos seguimos teniendo nuestro punto de encuentro en “lo verde” de la Plaza San Francisco.

Gracias también a Raquel, Carmen, Edu, Elena, Álex, Blanca, César y Yoli. Siempre pasamos grandes momentos.

Gracias a la familia de Pin por su cariño y constante alegría.

A toda mi familia de Zaragoza y Mas de las Matas, muchísimas gracias por vuestro apoyo y cariño.

A mis abuelos. Sois un ejemplo de trabajo, constancia y generosidad. Gracias por querer lo mejor para mí.

A mis padres, Coro y Emilio. Gracias por vuestros grandes consejos, por darme tanto y quererme tanto. Sois geniales e imprescindibles. Me gustaría parecerme a vosotros.

A mis hermanos, Dani y Guille. Me gusta cuando estamos juntos y es cómo si el tiempo no hubiera pasado; 3 críos que se “chinchán” y juegan a la vez. Gracias porque siempre estáis dispuestos a ayudarme. A Elisa, gracias por llegar y completar esta familia.

Y por último, gracias a la persona que tengo a mi lado y me saca una sonrisa con sólo mirarla. Gracias Pin. Gracias por ser lo mejor de la vida.

Jorge

RESUMEN/SUMMARY

En la presente tesis hemos analizado diferentes aspectos de la topología del DNA en bacterias y levaduras.

Para optimizar la separación de topoisómeros de DNA plasmídico de igual masa total pero que difieren en su grado de superenrollamiento, encadenamiento o anudamiento, variamos sistemáticamente las condiciones de electroforesis bidimensional en geles de agarosa. Las diferencias observadas nos permiten mejorar las condiciones para su identificación y separación.

También abordamos la dinámica de la topología del DNA durante la replicación, concretamente, el posible giro de las horquillas durante la replicación y la consecuente formación de pre-encadenados. Una vez aislado el DNA, las horquillas pueden girar libremente *in vitro* permitiendo la difusión de la tensión torsional de la región no replicada a la ya replicada (y viceversa) logrando un equilibrio termodinámico. Examinamos los intermediarios de replicación (RIs) de tres plásmidos bacterianos con la horquilla detenida en diferentes posiciones y aislados de células con la Topoisomerasa IV (Topo IV) activa o inactiva *in vivo*. Los resultados obtenidos indican que los RIs están más torsionados cuando se aíslan de células sin Topo IV. Esta observación sugiere que las horquillas giran *in vivo* dando lugar a la formación de pre-encadenados a lo largo de la replicación.

Finalmente, estudiamos los intermediarios y productos de replicación de minicromosomas artificiales de levaduras (YACs) circulares y lineales en presencia y en ausencia de la Topoisomerasa 2 (Topo 2). Los resultados obtenidos confirman que en ausencia de Topo 2 los YACs circulares se acumulan en forma de encadenados mientras que los YACs lineales son capaces de replicar y segregar. Los patrones de los RIs de los YACs circulares y lineales mostraron diferencias significativas que indican que el superenrollamiento del DNA podría desempeñar un papel clave en la modulación de la progresión de las horquillas de replicación.

In the present thesis, we have analyzed different aspects of the DNA topology in bacteria and yeast.

We systematically varied conditions of two-dimensional (2D) agarose gel electrophoresis to optimize separation of DNA topoisomers where each member had the same total molecular mass but they differ either by the extent of supercoiling, the extent of catenation or the extent of knotting. The differences observed in the different families of topoisomers during electrophoresis permitted us to optimize conditions for their separation.

We address the dynamics of DNA topology during replication. Swiveling of the fork and formation of precatenanes *in vivo* is still questioned. Anyway, once DNA is isolated, forks do rotate freely *in vitro* allowing diffusion of the torsional tension from the replicated to the unreplicated region and *vice-versa* to achieve thermodynamic equilibrium. We examined the replication intermediates (RIs) of three bacterial plasmids with the fork stalled at different sites before termination and isolated from cells where the Topoisomerase IV (Topo IV) is active or inactive *in vivo*. The results obtained indicated that RIs were more torsionally tensioned when isolated from cells without Topo IV. This observation strongly suggests that forks do swivel *in vivo* leading to the formation of precatenanes as replication progresses.

Finally, we study the RIs and final products of small circular and linear minichromosomes of *Saccharomyces cerevisiae* (YACs) in the presence and absence of DNA Topoisomerase 2 (Topo 2). The results obtained confirmed that whereas for circular YACs catenated sister duplexes accumulated in the absence of Topo 2, linear YACs were able to replicate and segregate regardless of this topoisomerase. Moreover, the patterns of RIs for circular and linear YACs displayed significant differences suggesting that DNA supercoiling might play a key role in the modulation of replication fork progression.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Topología del DNA	3
1.2. Propiedades topológicas del DNA.....	4
1.3. DNA topoisomerasas	6
1.3.1. DNA topoisomerasas de tipo I.....	7
1.3.2. DNA topoisomerasas de tipo II.....	8
1.4. Topología de los RIs de plásmidos bacterianos.....	9
1.5. Organización y estructura del DNA en levaduras	12
1.5.1. Cromosomas artificiales de levadura (YACs)	13
1.6. Encadenamiento del DNA	13
1.7. Anudamiento del DNA.....	15
1.8. Métodos de análisis de moléculas de DNA con distintas formas topológicas	16
1.8.1. Electroforesis bidimensional en geles de agarosa.....	16
1.8.1.1. Análisis de moléculas de DNA intactas	17
1.8.1.2. Análisis de moléculas de DNA digeridas.....	18
1.9. Algunos problemas no resueltos de la topología del DNA	20

2. OBJETIVOS 23

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material biológico.....	29
3.2. Medios de cultivo	29
3.2.1. Medios y cultivo de <i>E. coli</i>	29
3.2.2. Medios y cultivo de <i>S. cerevisiae</i>	30
3.2.1.1. Sincronización de los cultivos de <i>S. cerevisiae</i>	31
3.3. Preparación de células de <i>S. cerevisiae</i> para su análisis mediante citometría de flujo	32

3.4. Plásmidos y minicromosomas	33
3.5. Transformación de <i>E. coli</i>	42
3.6. Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	42
3.7. Estudio de la estabilidad mitótica.....	43
3.8. Extracción del DNA	43
3.8.1. Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	43
3.8.1.1. Extracción total	43
3.8.1.2. Extracción de formas replicativas	43
3.8.2. Extracción de DNA plasmídico de <i>S. cerevisiae</i>	44
3.8.2.1. Extracción total	44
3.8.2.2. Extracción de formas replicativas	45
3.9. Digestiones enzimáticas	46
3.9.1. Digestiones enzimáticas con endonucleasas de restricción de cadena sencilla....	46
3.9.2. Digestiones enzimáticas con endonucleasas de restricción de doble cadena	46
3.10. Análisis de DNA	46
3.10.1. Electroforesis en geles de agarosa	46
3.10.1.1. Electroforesis unidimensional.....	46
3.10.1.2. Electroforesis bidimensional neutra-neutra	47
3.10.1.2.1. Electroforesis bidimensional de formas intactas	47
3.10.1.2.1. Electroforesis bidimensional de formas digeridas	48
3.10.2. Transferencia del DNA a soportes sólidos	48
3.10.3. Marcaje de sondas no radiactivas	49
3.10.4. Hibridación de ácidos nucleicos con sondas no radiactivas	49
3.10.5. Densitometría.....	49
3.10.6. Secuenciación	49
3.11. Extracción y purificación de RNA	50
3.12. RT-qPCR.....	50
3.12.1. Análisis de la expresión relativa mediante el modelo de Pfaffl	51

4. RESULTADOS

4.1. Estudio de la movilidad electroforética de moléculas superenrolladas, encadenadas y anudadas	55
4.1.1. Análisis de la movilidad electroforética de moléculas superenrolladas, encadenadas y anudadas en condiciones estándar	55
4.1.2. Análisis de la movilidad electroforética de moléculas superenrolladas, encadenadas y anudadas a diferentes voltajes en la segunda dimensión	61
4.1.3. Análisis de la movilidad electroforética de moléculas superenrolladas, encadenadas y anudadas a diferentes concentraciones de agarosa en la segunda dimensión	66
4.2. Estudio de la dinámica de los cambios topológicos durante la replicación de plásmidos bacterianos	70
4.2.1. Análisis de los RIs de pBR-TerE@ <i>StyI</i> , pBR-TerE@ <i>AatII</i> y pBR-TerE@ <i>DraI</i> aislados de células DH5 α F' mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa	70
4.2.2. Análisis de los RIs de pBR-TerE@ <i>StyI</i> , pBR-TerE@ <i>AatII</i> y pBR-TerE@ <i>DraI</i> aislados de células parE10 mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa	73
4.2.3. Análisis de los RIs de pBR-TerE@ <i>StyI</i> , pBR-TerE@ <i>AatII</i> y pBR-TerE@ <i>DraI</i> aislados de células DH5 α F' en presencia de Chl en segunda dimensión	75
4.2.4. Análisis de los RIs de pBR-TerE@ <i>StyI</i> , pBR-TerE@ <i>AatII</i> y pBR-TerE@ <i>DraI</i> aislados de células parE10 en presencia de Chl en segunda dimensión	77
4.2.5. Comparación de los RIs anudados de los plásmidos pBR-TerE@ <i>StyI</i> , pBR-TerE@ <i>AatII</i> y pBR-TerE@ <i>DraI</i> aislados de células DH5 α F' y parE10	79
4.3. Estudio de la replicación, segregación y transcripción de minicromosomas circulares y lineales en <i>S. cerevisiae</i>	82
4.3.1. Construcción de minicromosomas artificiales circulares y lineales	82
4.3.2. Estudio del ciclo celular de la estirpe top2-td de <i>S. cerevisiae</i> transformada con los minicromosomas pYAC_MEM y YAC_MEM en presencia y ausencia de Topo 2.	86
4.3.3. Análisis de la estabilidad mitótica y del número de copias de pYAC_MEM y YAC_MEM en <i>S. cerevisiae</i>	88
4.3.4. Análisis de los RIs de pYAC_MEM y YAC_MEM	89
4.3.4.1. Análisis de los RIs de pYAC_MEM	90

4.3.4.2. Análisis de los RIs de YAC_MEM.....	94
4.3.5. Análisis de los productos de segregación de pYAC_MEM y YAC_MEM	95
4.3.5.1. Análisis de los productos de segregación de pYAC_MEM.....	95
4.3.5.2. Análisis de los productos de segregación de YAC_MEM.....	97
4.3.6. Construcción de minicromosomas artificiales circulares y lineales con una barrera para las horquillas de replicación (RFB) y análisis de sus RIs	98
4.3.7. Estudio de la transcripción del gen <i>URA3</i> en pYAC_MEM y YAC_MEM	99
 5. DISCUSIÓN	
5.1. Movilidad electroforética de moléculas superenrolladas, encadenadas y anudadas .	105
5.2. Dinámica de los cambios topológicos durante la replicación de plásmidos bacterianos.....	107
5.2.1. Anudamiento de cromátidas hermanas durante la replicación de plásmidos en <i>E. coli</i>	113
5.3. Replicación, segregación y transcripción de minicromosomas circulares y lineales en <i>S. cerevisiae</i>	114
5.3.1. Papel del superenrollamiento en la progresión de las horquillas de replicación: centrómero y barrera RFB	114
5.3.2. Desplazamiento asimétrico de las horquillas de replicación	115
5.3.3. Iniciación de la replicación en los telómeros.....	117
5.3.4. Segregación de minicromosomas circulares y lineales en ausencia de Topo 2..	117
5.3.5. La tensión torsional del cromosoma lineal se disipa por los telómeros permitiendo la segregación en ausencia de Topo 2	118
5.3.6. Transcripción del gen <i>URA3</i> en minicromosomas circulares y lineales	119
5.3.7. Consideraciones acerca de la necesidad de la Topo 2	120
 6. CONCLUSIONES	121
 7. BIBLIOGRAFÍA	125

8. MATERIAL SUPLEMENTARIO	147
9. PUBLICACIONES	155
Cebrián J. [*] , Monturus E. [*] , Martínez-Robles M.L., Hernández P., Krimer D.B. y Schwartzman J.B. (2014). <i>Topoisomerase 2 is dispensable for the replication and segregation of small yeast artificial chromosomes (YACs)</i> . PLOS ONE. doi:10.1371/journal.pone.0104995.....	157
Cebrián J., Kadomatsu-Hermosa M.J., Castán A., Martínez V., Parra C., Fernández-Nestosa M.J., Schaerer C., Martínez-Robles M.L., Hernández P., Krimer D.B., Stasiak A. y Schwartzman J.B. (2014). <i>Electrophoretic mobility of supercoiled, catenated and knotted DNA molecules</i> . Nucleic Acids Research. doi:10.1093/nar/gku1255.....	169
Cebrián J. [*] , Castán A. [*] , Martínez V., Parra C., Kadomatsu-Hermosa M.J., Fernández-Nestosa M.J., Schaerer C., Hernández P., Krimer D.B. y Schwartzman J.B. (2015). <i>Direct evidence for the formation of precatenanes during DNA replication</i> . The Journal of Biological Chemistry. doi:10.1074/jbc.M115.642272.....	179

ABREVIATURAS

Además de las unidades y abreviaturas aceptadas por el Sistema Internacional de Medidas, en esta Tesis se han utilizado las siguientes abreviaturas:

ARS	Secuencia de replicación autónoma de <i>S. cerevisiae</i> (<i>Autonomous replication sequence</i>)
ATP	Adenosín trifosfato (<i>Adenosine triphosphate</i>)
ΔC	Variación de la complejidad topológica (<i>Topological complexity difference</i>)
Ca	Número de encadenamiento (<i>Catenation number</i>)
CatA	Encadenado de tipo A (<i>Type A catenate</i>)
CatB	Encadenado de tipo B (<i>Type B catenate</i>)
CatC	Encadenado de tipo C (<i>Type C catenate</i>)
CCC	Molécula circular covalentemente cerrada (<i>Covalently closed circle</i>)
CCCm	Monómero circular covalentemente cerrado (<i>Monomeric covalently closed circle</i>)
CCCd	Dímero circular covalentemente cerrado (<i>Dimeric covalently closed circle</i>)
CCRI	Intermediario de replicación covalentemente cerrado (<i>Covalently closed replication intermediate</i>)
cDNA	DNA complementario (<i>Complementary DNA</i>)
Chl	Cloroquina (<i>Chloroquine</i>)
Ct	Ciclo umbral (<i>Cycle threshold</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminetetracético (<i>Ethylenediaminetetracetic acid</i>)
EthBr	Bromuro de etidio (<i>Ethidium bromide</i>)

Kb	Kilopares de bases (<i>Kilobase pairs</i>)
Kn	Nudo (<i>Knot</i>)
Knm	Monómero anudado (<i>Knotted monomer</i>)
Knd	Dímero anudado (<i>Knotted dimer</i>)
LB	Medio de cultivo Luria Bertani (<i>Culture medium Luria Bertani</i>)
Lms	Lineales de monómeros (<i>Monomer linears</i>)
Lds	Lineales de dímeros (<i>Dimeric linears</i>)
Lk	Índice de ligamiento (<i>Linking number</i>)
Lk₀	Índice de ligamiento de un DNA relajado (<i>Linking number of relaxed DNA</i>)
ΔLk	Variación del índice de ligamiento con respecto al índice de ligamiento del DNA relajado (<i>Linking number difference</i>)
NIB	Buffer de aislamiento nuclear (<i>Nuclear isolation buffer</i>)
OC	Molécula circular con una o más roturas de cadena sencilla (<i>Open circle</i>)
OCm	Molécula monomérica circular con una o más roturas de cadena sencilla (<i>Monomeric open circle</i>)
OCd	Molécula dimérica circular con una o más roturas de cadena sencilla (<i>Dimeric open circle</i>)
OD	Densidad óptica (<i>Optical density</i>)
OCRI	Intermediario de replicación relajado (<i>Open circle replication intermediate</i>)
Ori	Origen de replicación (<i>Replication origin</i>)
pb	Pares de bases (<i>base pairs</i>)
RFB	Barrera para las horquillas replicativas (<i>Replication fork barrier</i>)

RcI	Intermediario de recombinación (<i>Recombination intermediate</i>)
RI	Intermediario de replicación (<i>Replication intermediate</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
Scd	Dímero superenrollado (<i>Supercoiled dimer</i>)
Scm	Monómero superenrollado (<i>Supercoiled monomer</i>)
SDS	Dodecil sulfato sódico (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SSC	Solución salina de citrato de sodio (<i>Saline Sodium-Citrate</i>)
SSPE	Solución salina de fosfato de sodio (<i>Saline Sodium-Phosphate-EDTA</i>)
Ter	Sitio de terminación de la replicación del DNA (<i>DNA replication terminus site</i>)
TBE	Tris-Borato-EDTA (<i>Tris-Borate-EDTA</i>)
Topo 2	Topoisomerasa 2 de <i>S. cerevisiae</i> (<i>Topoisomerase 2</i>)
Topo 3	Topoisomerasa 3 de <i>S. cerevisiae</i> (<i>Topoisomerase 3</i>)
Topo I	Topoisomerasa I de <i>E. coli</i> (<i>Topoisomerase I</i>)
Topo II	Topoisomerasa II de <i>E. coli</i> (<i>Topoisomerase II</i>)
Topo III	Topoisomerasa III de <i>E. coli</i> (<i>Topoisomerase III</i>)
Topo IV	Topoisomerasa IV de <i>E. coli</i> (<i>Topoisomerase IV</i>)
Tris	Tris hidroximetil aminometano (<i>Tris hydroxymethyl aminomethane</i>)
Tus	Proteína de unión a Ter (<i>Terminator utilization substance</i>)
Tw	Índice de torsión (<i>Twist</i>)
Wr	Índice de superenrollamiento (<i>Writhe</i>)
ΔW_r	Variación del índice de superenrollamiento con respecto al superenrollamiento del DNA relajado (<i>Writhe difference</i>)

(+) Positivo (*Positive*)

(-) Negativo (*Negative*)

1. INTRODUCCIÓN

El DNA es una doble hélice constituida por dos cadenas de polinucleótidos complementarias y antiparalelas. La conformación más frecuente es la denominada DNA-B, una doble hélice dextrógira con un período de aproximadamente 10,5 pares de bases (pb) (Watson and Crick, 1953b). La estructura en doble hélice permite vislumbrar su mecanismo de replicación, revelando cómo se transmite la información genética de una célula madre a sus dos células hijas (Watson and Crick, 1953a, b). La estructura, organización y topología del DNA son el foco de estudio de numerosas investigaciones.

1.1. Topología del DNA

Según la Real Academia Española, la topología es una rama de las Matemáticas que trata especialmente de la continuidad y de otros conceptos más generales originados de ella, como las propiedades de las figuras con independencia de su tamaño o forma. Dicho de otro modo, la topología estudia las propiedades de un cuerpo que no varían cuando éste se deforma.

El descubrimiento de la estructura en doble hélice del DNA llevó a preguntar cómo se produce la separación de las dos hebras entrelazadas durante la replicación de la molécula y cómo se resuelven los problemas topológicos derivados de ella (Cairns, 1963; Worcel and Burgi, 1972). En 1965, Vinograd y colaboradores fueron pioneros en determinar las distintas formas topológicas que puede adoptar el DNA (Vinograd et al., 1965). Observaron al microscopio electrónico que el DNA del virus del poliooma podía encontrarse tanto en forma lineal como circular. Las moléculas circulares, además, podían presentar distinto grado de complejidad, desde moléculas relajadas hasta enrolladas sobre sí mismas. A cada una de estas isoformas se les denominó topoisómeros, que se definen como las diferentes conformaciones espaciales que pueden adoptar las moléculas de DNA circulares covalentemente cerradas (CCCs) de igual masa. Posteriormente, esta observación fue ampliada a todas las moléculas de DNA circulares de cadena doble (Cozzarelli, 1980). El hallazgo de que en todos los seres vivos el DNA está superenrollado junto con el descubrimiento de las enzimas encargadas de modular su topología *in vivo* (Wang, 1971), sentaron las bases de una nueva disciplina a medio camino entre las Matemáticas y la Biología Molecular denominada “Topología del DNA” (Wang, 2002).

La necesidad del estudio a nivel topológico del DNA viene avalada por el hecho de que los cambios en su topología son esenciales en la mayoría de los procesos celulares (replicación, transcripción, segregación, etc.).

1.2. Propiedades topológicas del DNA

Se han descrito dos conformaciones para el DNA superenrollado (Figura 1A): la plectonémica, característica del DNA de procariotas, y la toroidal, típica de eucariotas. El superenrollamiento plectonémico es un tipo de conformación en la que la doble hélice del DNA se enrolla alrededor de otra parte de la misma molécula formando una hélice de orden superior (Bates and Maxwell, 2005). Por el contrario, en el superenrollamiento toroidal la doble hélice del DNA se enrolla alrededor de un torus o aro imaginario formando una hélice de orden superior (Bates and Maxwell, 2005). Este último es el que presenta el DNA de los organismos eucariotas, enrollado alrededor de los nucleosomas, que favorece la condensación del DNA necesaria para su empaquetamiento dentro del núcleo (Boles et al., 1990).

El parámetro que mejor define la topología de una molécula circular covalentemente cerrada (CCC) es el índice de ligamiento (Lk). Este parámetro mide el número de veces que una cadena de la doble hélice cruza a la otra en un plano (Bates and Maxwell, 1997; Kornberg and Lorch, 1992) o dicho de otra manera, es la medida del enrollamiento de la doble hélice sobre sí misma (Lewin, 2000). El Lk es una constante invariable y corresponde siempre a un número entero. Si se considera la estructura tridimensional de la molécula de DNA, se define el Lk en base a dos parámetros geométricos: el índice de torsión (Tw del inglés *Twist*) y el índice de superenrollamiento (Wr del inglés *Writhe*).

El Tw indica el número de veces que cada una de las cadenas de polinucleótidos gira en el espacio alrededor del eje axial de la doble hélice. Para el caso de moléculas de DNA-B relajadas, su valor viene dado por la siguiente ecuación:

$$Tw = N / 10,5 \quad (1)$$

Siendo N el número de pb de la molécula de DNA y 10,5 el número de pb por una vuelta completa de cada una de las dos cadenas de polinucleótidos de la doble hélice.

El W_r es una medida de la torsión del eje axial de la doble hélice sobre sí mismo: mide el número de veces que el eje de la doble hélice se cruza sobre sí mismo en un plano bidimensional (Bates and Maxwell, 1997; Kornberg and Baker, 1992; Lewin, 2000). Por convenio, el W_r es negativo (-) en el caso de las superhélices dextrógiras y positivo (+) en el de las levógiras (Bates and Maxwell, 1997; Schvartzman and Stasiak, 2004). En casi todos los seres vivos, las moléculas presentan un W_r (-), aunque existen excepciones como es el caso de las bacterias termófilas del género *Archaea*, cuyo DNA presenta un W_r (+) que se incrementa con el aumento de la temperatura (Mirambeau et al., 1984).

L_k , T_w y W_r están relacionados según la siguiente ecuación:

$$L_k = T_w + W_r \quad (2)$$

Esta ecuación indica que en todo dominio topológico cerrado el T_w está directamente relacionado con el W_r y ambas variables se compensan entre sí, dando como resultado el valor de L_k , que se mantiene constante. El L_k es una propiedad exclusiva de los dominios topológicos cerrados. Si uno de los extremos (o los dos) de la doble hélice está libre, una o las dos cadenas de la misma pueden girar la una sobre la otra, liberando dicha tensión por los extremos (Bauer et al., 1980). De este modo, el superenrollamiento sólo tiene lugar en moléculas CCC o en moléculas lineales fijadas a membranas u otros elementos proteicos, de manera que una región, aunque lineal, se comporta como un dominio topológicamente cerrado. Las moléculas CCCs son típicas del genoma de bacterias, plásmidos, mitocondrias, cloroplastos y diversos virus. En cambio, el DNA de los cromosomas de eucariotas es lineal y está organizado en bucles o lazos cuya base está unida covalentemente a un esqueleto proteico por lo que constituyen dominios topológicos cerrados equivalentes a las CCCs (Giaever and Wang, 1988; Marsden and Laemmli, 1979; Schiessel et al., 2001).

Otra manera de expresar los cambios del L_k de una molécula determinada es refiriéndolos a la situación que presenta dicha molécula en su estado relajado. En el caso

de una molécula relajada, en la que el Wr sea igual a 0, el Lk es determinado sólo por el Tw . Cualquier cambio del grado de superenrollamiento referido al Lk de una molécula relajada (Lk_0) se representa mediante la ecuación:

$$\Delta LK = Lk - Lk_0 \quad (3)$$

El Lk puede modificarse si se producen roturas en el DNA (Wang, 1996). Éstas pueden ser de cadena sencilla o de cadena doble y, en cualquier caso, dan como resultado la eliminación del superenrollamiento debido a que la rotura permite a la hebra implicada girar libremente sobre la otra disipando la tensión (Figura 1B). En todo dominio topológico cerrado *in vivo* los procesos de transcripción, replicación y recombinación alteran el Tw y el Wr pero no el Lk . Para alterar el Lk *in vivo* las células disponen de unas enzimas especializadas denominadas topoisomerasas del DNA.

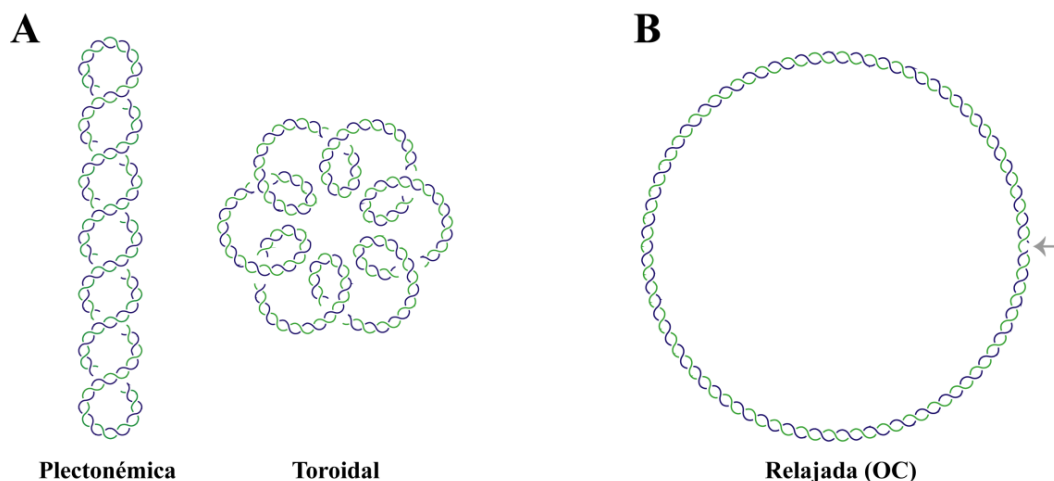


Figura 1. Esquema representativo de las distintas formas que puede adoptar una molécula de DNA.
A: Forma superenrollada con una conformación plectonémica (a la izquierda) y toroidal (a la derecha).
B: Forma relajada (OC). La flecha gris indica una rotura de cadena sencilla en la doble hélice.

1.3. DNA topoisomerasas

Las topoisomerasas son las enzimas encargadas de modificar la topología del DNA *in vivo*, ayudando a solucionar los problemas topológicos que surgen durante la replicación, transcripción, reparación, recombinación y segregación del DNA. Durante estos procesos es necesario separar las cadenas complementarias y, como consecuencia, se

crea una tensión que debe ser eliminada para poder continuar con la separación. Para eliminar dicho exceso de torsión (tensión torsional) se produce una rotura transitoria en el DNA acompañada de la formación de un enlace fosfodiéster entre un residuo activo de tirosina presente en la enzima y un grupo fosfato en uno de los extremos de la cadena de DNA interrumpida. La topología de la molécula de DNA puede ser modificada durante el tiempo que se mantenga ese enlace. Finalmente, el enlace se rompe y la enzima vuelve a unir los extremos rotos del DNA. Así pues, debido al papel crucial que desempeñan para la supervivencia celular, las topoisomerasas del DNA son dianas de numerosas drogas citotóxicas (Drlica and Malik, 2003; Froelich-Ammon and Osheroff, 1995; Hande, 1998; Kathiravan et al., 2013; Pommier et al., 1998). En base a su mecanismo de acción las topoisomerasas se clasifican en dos grandes grupos: tipo I y tipo II, según corten una o ambas hebras de la doble hélice del DNA, respectivamente.

1.3.1. DNA topoisomerasas de tipo I

Las topoisomerasas de tipo I cortan una cadena de la doble hélice y la hacen rotar una vuelta completa sobre la hebra intacta para, finalmente, volver a unir los extremos cortados cambiando el Lk en valores de ± 1 (Brown and Cozzarelli, 1981).

Las topoisomerasas de tipo I bacterianas sólo son capaces de relajar el superenrollamiento (-). *Escherichia coli* (*E. coli*) posee dos topoisomerasas de tipo I: la Topoisomerasa I (Topo I) (Wang, 1971) y la Topoisomerasa III (Topo III) (Dean et al., 1983). Deleciones en la Topo I causan un incremento de superenrollamiento (-), que sólo es tolerado en presencia de mutaciones compensatorias en la DNA girasa que, su vez, reducen el nivel de superenrollamiento (DiNardo et al., 1982). Además, la Topo I relaja el superenrollamiento (-) generado por detrás de la horquilla durante la transcripción (Liu and Wang, 1987). En cuanto a la Topo III, su papel biológico aún no está del todo definido. Sin embargo, interaccionando con la helicasa RecQ es capaz de encadenar y desencadenar *in vitro* el DNA (Harmon et al., 2003; Harmon et al., 1999; Hiasa et al., 1994; Nurse et al., 2003) y está implicada en procesos de recombinación y reparación (Plank et al., 2006; Seki et al., 2006).

Las topoisomerasas de tipo I de las células eucariotas, en cambio, son capaces de relajar tanto el superenrollamiento (-) como el (+). En *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) se conocen dos topoisomerasas de este tipo: la Topo I (Goto and Wang, 1985), que realiza un papel fundamental durante la transcripción, y la Topo 3 (Kim and Wang, 1992), que está implicada en el desencadenamiento *in vitro* del DNA junto con la helicasa Sgs1 (Cejka et al., 2012; Harmon et al., 1999), actúa en el mantenimiento de la estabilidad genómica y está implicada en la resolución de intermediarios de replicación (RIs) durante la reparación del DNA (Goodwin et al., 1999; Maftahi et al., 1999; Wallis et al., 1989).

1.3.2. DNA topoisomerasas de tipo II

Las topoisomerasas de tipo II cortan ambas cadenas de la doble hélice del DNA y transportan otra doble hélice intacta por el hueco formado en la ruptura para, finalmente, volver a unir los extremos cortados (Champoux, 2001; Nitiss, 1998; Wang, 1996, 1998) modificando el Lk en valores de ± 2 (Brown and Cozzarelli, 1979; Mizuuchi et al., 1978; Roca and Wang, 1994). Todas las enzimas de este tipo son dependientes de ATP (Huang, 1994).

En *E. coli* existen dos topoisomerasas de tipo II: la DNA girasa (Gellert et al., 1976) y la Topoisomerasa IV (Topo IV) (Kato et al., 1990; Kato et al., 1988). La DNA girasa fue la primera topoisomerasa de tipo II descrita y es la única conocida capaz de introducir superenrollamiento (-) en el DNA *in vivo* empleando la energía de la hidrólisis del ATP (Gellert et al., 1976). Se trata de un heterotetrámero compuesto por dos subunidades GyrA y dos subunidades GyrB (Klevan and Wang, 1980). Las subunidades GyrA están implicadas en la unión al DNA (Wang, 1998) y en la introducción de roturas transitorias en la doble hélice, mientras que la subunidades GyrB son las responsables de la actividad ATPasa. Esta enzima mantiene la densidad de superenrollamiento (-) necesaria para la iniciación de la replicación y la transcripción del DNA. Además, participa en la fase de elongación de la replicación y de la transcripción, contribuyendo a la eliminación del superenrollamiento (+) que se genera por delante de las horquillas debido a la acción de las helicasas. De este modo, la DNA girasa elimina el estrés torsional cuya acumulación podría, eventualmente, detener ambos procesos. Por su parte,

la Topo IV bacteriana (Kato et al., 1990) es también un heterotetrámero cuyas subunidades ParC y ParE son homólogas de GyrA y GyrB, respectivamente (Peng and Mariani, 1993). *In vivo*, la Topo IV está especializada en eliminar el encadenamiento que surge entre las cromátidas hermanas durante y después de la replicación del DNA (Adams et al., 1992; Deibler et al., 2001; Zechiedrich and Cozzarelli, 1995; Zechiedrich et al., 1997).

Las topoisomerasas de tipo II de eucariotas son capaces de relajar tanto el superenrollamiento (-) como el (+), pero son incapaces de introducir superenrollamiento (-). La única topoisomerasa de tipo II conocida en *S. cerevisiae* es la llamada Topo 2 y permite la correcta segregación de las cromátidas hermanas (DiNardo et al., 1984; Holm et al., 1985).

1.4. Topología de los RIs de plásmidos bacterianos

Como aparece en la parte izquierda de la Figura 1A, tanto *in vivo* como *in vitro* los plásmidos bacterianos están negativamente superenrollados y sus cruces intramoleculares son dextrógiros (Bednar et al., 1994; Bliska and Cozzarelli, 1987). Esta configuración facilita la separación de las cadenas parentales que serán usadas como molde por las DNA polimerasas durante la replicación (Crisona et al., 2000; Funnell et al., 1987; Mariani et al., 1986). A su vez, un complejo multiproteico, el replisoma, realiza la elongación. Por delante del replisoma se encuentra la DNA helicasa, una proteína hexamérica responsable de la apertura de la doble hélice parental (Schvartzman and Stasiak, 2004). Dicha apertura genera una tensión topológica que da lugar a un superenrollamiento (+) por delante de la horquilla de replicación (Alexandrov et al., 1999; Peter et al., 1998). Si este superenrollamiento (+) persiste y se acumula, impediría, eventualmente, el avance de la horquilla de replicación puesto que el superenrollamiento (+) dificulta la separación de las dos cadenas de la doble hélice. En bacterias, la DNA girasa y la Topo IV actúan juntas por delante de la horquilla para mantener la región no replicada del DNA negativamente superenrollada y deberían ser suficientes para que la replicación se complete (Sundin and Varshavsky, 1980). La DNA girasa introduce superenrollamiento (-) por delante de la maquinaria de replicación mientras que la Topo IV relaja parte del superenrollamiento (+)

que genera el avance de la horquilla (Cozzarelli, 1980; Levine et al., 1998; Marians, 1992). Sin embargo, estas acciones no son suficientes para compensar ese superenrollamiento (+) debido a que la procesividad de la DNA helicasa es mayor y el avance de la horquilla de replicación es más rápido que la DNA girasa introduciendo superenrollamiento (-) (Peter et al., 1998). En los estadios tempranos de la replicación, cuando la región no replicada es suficientemente grande, serían varias las DNA girasas que se unirían a esa región y su funcionamiento en serie podría conseguir la introducción de un nivel suficiente de superenrollamiento (-). Sin embargo, a medida que la replicación progresa, la región no replicada va disminuyendo, de manera que cada vez es menor el espacio en el que podría actuar la DNA girasa (Champoux and Been, 1980). Este déficit de DNA girasa podría conducir a la eliminación de todo el superenrollamiento (-) y a una eventual acumulación de superenrollamiento (+) por delante de la horquilla en las etapas tardías de la replicación. Para resolver esta aparente paradoja, Champoux y Been sugirieron que el superenrollamiento (+) que se acumula transitoriamente por delante de las horquillas de replicación de los RIs haría girar a las horquillas, difundiéndose este superenrollamiento (+) de la región no replicada a la ya replicada (Champoux and Been, 1980). Los cruces de las cromátidas hermanas en la región ya replicada se denominan pre-encadenados para distinguirlos de los cruces de superenrollamiento de la región no replicada (Peter et al., 1998). El nombre alude al hecho de que si esos pre-encadenados no son eliminados dan lugar a moléculas encadenadas al finalizar la replicación. En la región ya replicada actuaría la otra topoisomerasa de tipo II presente en bacterias, la Topo IV, la principal desencadenasa, ayudando a la DNA girasa a compensar el superenrollamiento (+) (Alexandrov et al., 1999; Peter et al., 1998; Ullsperger et al., 1995). La formación de pre-encadenados *in vivo*, no obstante, sigue siendo un tema controvertido. Algunos estudios sostienen su formación (Hiasa et al., 1994; Postow et al., 1999; Sogo et al., 1999) aunque otros afirman que si el replisoma está anclado a la membrana bacteriana, las horquillas no serían capaces de girar (Levine et al., 1998). En este sentido, varias moléculas de DNA girasa y Topo IV podrían unirse a la vez a la región no replicada de los RIs y su funcionamiento en serie podría compensar el superenrollamiento (+) para que la horquilla pudiera seguir avanzando. Pero cuando quedan unas 200 pb por replicar ya no habría sitio físico en la región no replicada para que estas enzimas pudieran unirse y actuar, por lo que la horquilla no podría avanzar más. Esta última región se replicaría mediante un sistema no convencional dando lugar a moléculas encadenadas con cruces

dextrógiros (Sundin and Varshavsky, 1980). En cualquier caso, si el encadenamiento entre dos moléculas de DNA es dextrógiro, como se asume generalmente (Adams et al., 1992), no constituye un sustrato adecuado para la Topo IV, ya que esta enzima actúa preferentemente sobre cruces levógiros (Crisona et al., 2000; Charvin et al., 2003). Esta nueva paradoja, conocida como la “Paradoja de la Topo IV”, sigue sin tener aún una solución aceptada de forma unánime.

Hay que tener en cuenta que el DNA examinado *in vitro* no necesariamente refleja su situación *in vivo*. En el proceso de aislamiento del DNA se eliminan todas las proteínas, por lo que las horquillas pueden girar libremente *in vitro*. Esta rotación permite la difusión de la tensión de la región no replicada a la ya replicada (y viceversa), hasta conseguir un equilibrio termonidámico (Ullsperger et al., 1995). En la Figura 2 se muestra un RI covalentemente cerrado (CCRI) en el que, al aislarse, parte del superenrollamiento (-) de la región no replicada migra a la ya replicada originando pre-encadenados. Esta redistribución ocurre de tal forma que los cruces dextrógiros de la región no replicada pasan a la región ya replicada como pre-encadenamientos levógiros.

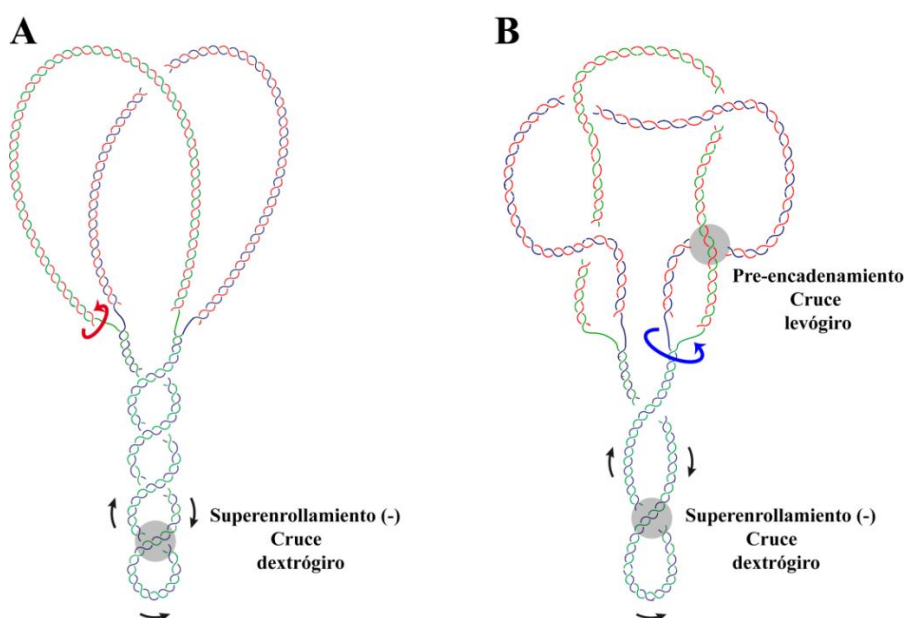


Figura 2. Esquema de un CCRI. A: CCRI cuya región no replicada presenta superenrollamiento (-) con cruces dextrógiros. La flecha roja indica la libertad de giro de las hebras nacientes en torno a su correspondiente hebra parental. B: CCRI tras la desprotección. La flecha azul hace referencia al giro de las horquillas de replicación *in vitro*, con el consiguiente paso del superenrollamiento de la región no replicada a la ya replicada en forma de pre-encadenamiento con cruces levógiros. En la región no replicada, las dos cadenas parentales se representan en azul y verde; en la región replicada las hebras nacientes se representan en rojo.

1.5. Organización y estructura del DNA en levaduras

En bacterias, los cromosomas son circulares y el DNA está organizado en dominios topológicos independientes que presentan diferentes niveles de superenrollamiento (Delius and Worcel, 1974; Postow et al., 2004; Sinden and Pettijohn, 1981). Por el contrario, en las células eucariotas, los cromosomas son lineales y el DNA está plegado en fibras de cromatina complejas. En estos casos es difícil la identificación de dominios topológicos cerrados y es, en la actualidad, un tema aún por resolver (Eissenberg et al., 1985; Esposito and Sinden, 1988; Freeman and Garrard, 1992). La replicación y la transcripción unidos a la actividad de las diferentes topoisomerasas son los principales factores conocidos involucrados en los cambios topológicos en células eucariotas (Brill and Sternglanz, 1988; Liu and Wang, 1987).

A diferencia de las células procariotas, en eucariotas es el enrollamiento del DNA alrededor de las histonas lo que provoca el superenrollamiento (+). Las topoisomerasas I y II de eucariotas son capaces de eliminar la acumulación de superenrollamiento generado por delante de la horquilla (Kim and Wang, 1992). Además, la asociación casi inmediata de los nucleosomas a las dos cromátidas hermanas detrás de la horquilla permite el correcto avance de las horquillas (Lucchini et al., 2001).

En *S. cerevisiae*, la Topo I relaja el superenrollamiento (+) y (-) generado por delante y por detrás, respectivamente, de la horquilla de replicación (Giaever et al., 1988; Kim and Wang, 1989; Liu and Wang, 1987). Se ha comprobado que los mutantes nulos para la Topo I son viables (Goto and Wang, 1985) y la Topo 2 es esencial para la viabilidad celular y separación de las cromátidas hermanas (DiNardo et al., 1984).

Durante la transcripción, el superenrollamiento (+) aumenta por delante del avance de la polimerasa y origina superenrollamiento (-) detrás de ella. Roca y colaboradores indujeron la acumulación de superenrollamiento (+) en el DNA de *S. cerevisiae* y mediante el análisis de *microarrays*, examinaron cómo las alteraciones en la transcripción se propagaban a través de los cromosomas. Observaron que, mientras la mayoría de los genes reducían los niveles de transcripción, los que estaban situados a menos de 100 kb del final de los cromosomas escapaban gradualmente a esta reducción (Joshi et al., 2010).

Estos resultados señalan que el superenrollamiento se disipa al final de los cromosomas, lo que indica que las extremidades de los cromosomas son zonas topológicamente abiertas.

1.5.1. Cromosomas artificiales de levadura (YACs)

En 1983, Murray y Szostak construyeron el primer YAC (de *Yeast Artificial Chromosome*) (Murray and Szostak, 1983). Los YACs son vectores que contienen los elementos mínimos de un cromosoma normal requeridos para su replicación y mantenimiento en células de levadura. Contienen un origen de replicación, un centrómero y secuencias teloméricas. Poseen además un origen de replicación bacteriano y un gen de resistencia a antibióticos para facilitar su amplificación en *E. coli* así como marcadores de selección de levaduras para el crecimiento por auxotrofia.

1.6. Encadenamiento del DNA

En el marco de la topología del DNA, el término encadenado alude a la unión topológica de dos o más moléculas circulares de DNA entrelazadas entre sí un número variable de veces. Vinograd y colaboradores observaron, mediante microscopía electrónica, moléculas encadenadas de DNA en mitocondrias de células humanas (Clayton and Vinograd, 1967; Hudson and Vinograd, 1967). Posteriormente, los encadenados se confirmaron como productos o como intermediarios en procesos de recombinación (Mizuuchi et al., 1980) y se estudió su formación y resolución *in vitro* (Kreuzer y Cozzarelli, 1980). Lo más común es que los encadenados aparezcan como intermediarios o como producto final de la replicación de moléculas de DNA circulares; de hecho, la formación de encadenados es una de las consecuencias topológicas de su replicación. Tanto en procariotas como en eucariotas el superenrollamiento contribuye a la resolución del encadenamiento que tiene lugar durante la replicación. Así, mientras que en bacterias es fundamental el superenrollamiento (-) introducido por la DNA girasa (Martinez-Robles et al., 2009; Vologodskii, 2010) en eucariotas es necesario el superenrollamiento (+) inducido por la formación de los husos mitóticos y la presencia de la condensina Smc2 (Baxter et al., 2011).

La acumulación de encadenados que se observa al inhibir las topoisomerasas de tipo II pone en evidencia que éstas son las encargadas de eliminar el encadenamiento en el DNA (Adams et al., 1992; Hiasa and Marians, 1996; Levine et al., 1998; Lucas et al., 2001; Peng and Marians, 1993). La desencadenasa *in vivo* en *E. coli* es la Topo IV (Zechiedrich and Cozzarelli, 1995; Zechiedrich et al., 1997), mientras que en *S. cerevisiae* es la Topo 2 (DiNardo et al., 1984; Holm et al., 1985).

Las moléculas de DNA encadenadas se clasifican en base a la naturaleza de las moléculas encadenadas (Figura 3). Existen tres tipos de encadenados: de tipo A o CatA, en los que las dos moléculas de DNA circular poseen una rotura de cadena sencilla y, por tanto, están relajadas (ambas son OCs); CatB en donde sólo una de las dos moléculas está relajada (OC), mientras que la otra está covalentemente cerrada (CCC) y puede albergar superenrollamiento; y CatC, en los que ambas moléculas encadenadas están covalentemente cerradas (CCC), con superenrollamiento. Hay dos parámetros topológicos para definir los encadenados: el parámetro n definido como el número de cruces que presentan las moléculas encadenadas al proyectarlas en un plano bidimensional; y el número de encadenamiento, Ca , cuyo valor es siempre la mitad del número de cruces.

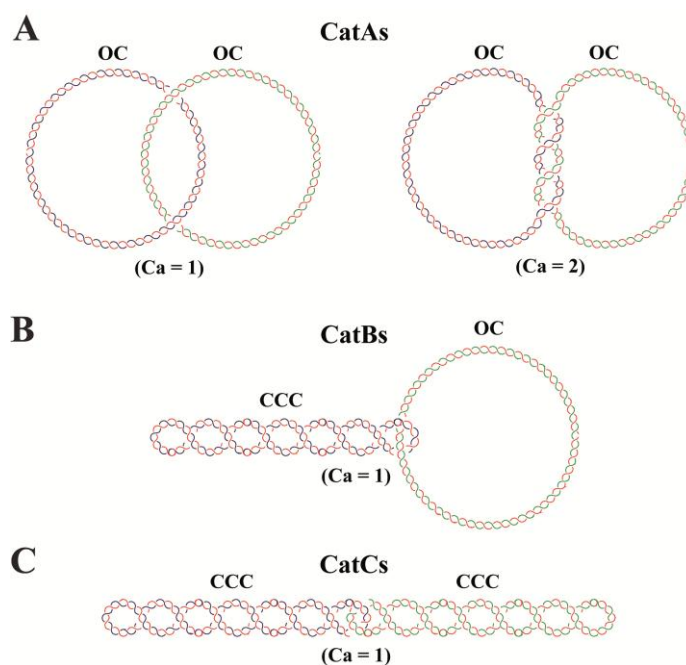


Figura 3. Tipos de encadenados de DNA. **A:** Encadenados tipo A (CatAs), formados por dos moléculas relajadas u OCs, con un encadenamiento (a la izquierda) y con dos encadenamientos (a la derecha). **B:** Encadenados tipo B (CatBs), formados por una molécula relajada (OC) y una superenrollada (CCC) con un encadenamiento. **C:** Encadenados tipo C (CatCs) formado por dos moléculas superenrolladas (CCC) con un encadenamiento entre ellas. Ca = número de encadenamiento que presenta la molécula.

1.7. Anudamiento del DNA

El anudamiento es otra de las propiedades topológicas del DNA (Bauer et al., 1980). Los nudos en el DNA pueden surgir de cualquier proceso que implique roturas en la doble hélice del DNA (replicación, transcripción, recombinación y reparación) y, de no ser eliminados, sus efectos resultan devastadores para la célula (Deibler et al., 2007; Deibler et al., 2001; Olavarrieta et al., 2002a; Portugal and Rodriguez-Campos, 1996).

Existen varios sistemas de clasificación y nomenclatura de nudos (White et al., 1987). El tipo de nudo más simple es el nudo de 3 cruces, llamado nudo en forma de hoja de trébol. En el análisis por electroforesis bidimensional el superenrollamiento enmascara las moléculas anudadas. Por ello, para visualizar nudos en una electroforesis es necesario producir roturas de cadena sencilla para eliminar el superenrollamiento. A su vez, la movilidad electroforética de las moléculas anudadas depende del tipo de nudo y del número de cruces del mismo (Stasiak et al., 1996).

En 1976 James Wang y colaboradores fueron los primeros en observar nudos en moléculas de DNA circular de cadena sencilla del bacteriófago fd tratadas con una proteína de *E.coli* entonces llamada ω y que resultó ser la Topo I (Liu et al., 1976). Esta topoisomerasa crea nudos en DNA de doble cadena, siempre y cuando éste tenga una pequeña región de cadena sencilla (Brown and Cozzarelli, 1981; Dean and Cozzarelli, 1985; Dean et al., 1985). Varios autores demostraron, con estudios *in vitro*, la formación de nudos en DNA de doble cadena por enzimas implicadas en procesos de recombinación, como la resolvasa Tn3 (Wasserman and Cozzarelli, 1985; Wasserman et al., 1985) y la integrasa Int del bacteriófago λ (Spengler et al., 1985).

En cuanto al anudamiento *in vivo*, la información sigue siendo escasa. Por un lado, se han observado nudos en el DNA de cadena doble de la cápside de algunos bacteriófagos (Liu et al., 1981a; Liu et al., 1981b). Por otro lado, se han observado RIs de plásmidos bacterianos anudados con horquillas de replicación detenidas. (Olavarrieta et al., 2002a; Olavarrieta et al., 2002c; Santamaria et al., 2000a; Santamaria et al., 2000b; Sogo et al., 1999; Viguera et al., 1996). La enzima responsable de anudar y desanudar en estos plásmidos bacterianos es la Topo IV (Deibler et al., 2001; Lopez et al., 2012).

1.8. Métodos de análisis de moléculas de DNA con distintas formas topológicas

Uno de los primeros métodos para el análisis de moléculas de DNA con distintas formas topológicas fue la centrifugación en gradientes de densidad (Vinograd et al., 1965). Este método fue sustituido por la electroforesis en geles de agarosa por tratarse de una técnica más versátil que permite diferenciar moléculas superenrolladas, así como encadenadas y/o anudadas con distinto número de cruces (Shishido et al., 1989; Shishido et al., 1987; Stasiak et al., 1996; Sundin and Varshavsky, 1980, 1981; Vologodskii et al., 1998). Para el estudio de moléculas individuales, las dos técnicas más usadas son la microscopía electrónica y la microscopía de fuerza atómica. En ambos casos, es importante engrosar el DNA con la proteína RecA para identificar las posiciones relativas de las moléculas en los cruces y determinar sus signos (Di Capua et al., 1982; Krasnow et al., 1983; Lopez et al., 2012; Sogo et al., 1999; Stasiak and Di Capua, 1982; Stasiak et al., 1981; Yamaguchi et al., 2000).

Finalmente, merece especial atención la electroforesis bidimensional en geles de agarosa.

1.8.1. Electroforesis bidimensional en geles de agarosa

La electroforesis bidimensional en geles de agarosa fue utilizada originalmente para separar intermediarios de recombinación (RCIs) ramificados de moléculas lineales (Bell and Byers, 1983) y posteriormente fue adaptada para analizar RIs lineales (Brewer and Fangman, 1987). La electroforesis bidimensional en geles de agarosa es una de las herramientas más frecuentemente empleada en el mapeo de orígenes de replicación (Bach et al., 2003; Brewer and Fangman, 1987; Friedman and Brewer, 1995; Gahn and Schildkraut, 1989; Martin-Parras et al., 1991; Schvartzman et al., 1990; Vaughn et al., 1990; Villwock and Aparicio, 2014), términos (Santamaria et al., 2000a; Santamaria et al., 2000b; Zhu et al., 1992) y barreras para el progreso de las horquillas (Brewer and Fangman, 1988; Hernandez et al., 1993; Linskens and Huberman, 1988; Little et al., 1993; Wiesendanger et al., 1994). Además, permite resolver las distintas formas topológicas que pueden adoptar los CCCs (Lucas et al., 2001; Martin-Parras et al., 1991; Schvartzman et

al., 1990) y es la herramienta idónea para la identificación de moléculas de DNA lineales con una burbuja interna anudada (Santamaria et al., 2000b; Sogo et al., 1999; Viguera et al., 1996). La posibilidad de añadir un agente intercalante durante la primera y/o la segunda dimensión aumenta aún más su poder de resolución (Martin-Parras et al., 1998).

Esta técnica, que se realiza en dos etapas, se basa en que la movilidad electroforética de una molécula de DNA en un gel de agarosa depende no sólo del tamaño del fragmento analizado sino también de su forma, de la concentración de agarosa presente en el gel y de la fuerza del campo eléctrico al que se somete la molécula. La primera dimensión transcurre en condiciones de bajo voltaje y bajo porcentaje de agarosa en el gel separándose las moléculas, fundamentalmente, en función de su masa. La segunda dimensión transcurre en condiciones de alto voltaje y alto porcentaje de agarosa separándose las moléculas, principalmente, en función de su forma. De este modo, es posible analizar mezclas de poblaciones de moléculas con distintas masas y formas.

1.8.1.1 Análisis de moléculas de DNA intactas

Las moléculas circulares de DNA adoptan distintas conformaciones *in vivo*. Se han caracterizado monómeros, multímeros y diferentes tipos de encadenamientos y anudamientos por distintos métodos (Dean et al., 1985; Shishido et al., 1989; Shishido et al., 1987; Sundin and Varshavsky, 1980, 1981). La electroforesis bidimensional permite el análisis e identificación simultánea de los topoisómeros de todas estas poblaciones (Lucas et al., 2001; Martin-Parras et al., 1998).

En una electroforesis bidimensional, las moléculas intactas de DNA generan los patrones que se representan en la Figura 4A. La señal que aparece en la parte inferior derecha corresponde a las formas superenrolladas de los monómeros que no están replicando en el momento en el que se detiene el cultivo, los CCCms (Martin-Parras et al., 1998; Schwartzman et al., 1990). Cuando estas moléculas sufren roturas de cadena sencilla durante la extracción del DNA dan lugar a moléculas monoméricas relajadas, los OCms. Entre ambas señales los distintos topoisómeros de monómeros con distinto grado de superenrollamiento, los Scms (en color negro), forman un arco. En poblaciones

multiméricas, partiendo de la señal de OCms se aprecia un segundo arco correspondiente a moléculas diméricas superenrolladas (Scds, en color azul) que presenta menor movilidad electroforética que el arco de Scms tanto en primera como en segunda dimensión. Si el material de DNA se trata con una endonucleasa de restricción de cadena sencilla, se revelan las moléculas anudadas: los monómeros anudados (Knms en color naranja) y los dímeros anudados (Knds en color magenta). Las tres poblaciones de moléculas monoméricas encadenadas (CatAs, CatBs y CatCs, en verde) dan lugar a tres arcos alrededor de los OCms.

1.8.1.2 Análisis de moléculas de DNA digeridas

La electroforesis bidimensional también se utiliza para separar los RIs y el resto de moléculas de DNA ramificadas de las moléculas no replicadas. Añadiendo un agente intercalante, generalmente bromuro de etidio (EthBr), durante la segunda dimensión las moléculas de DNA pierden elasticidad y se vuelven más rígidas potenciando la influencia de su estructura tridimensional. En estas condiciones, las moléculas ramificadas tienen menor movilidad que las moléculas lineales de igual masa.

En una electroforesis bidimensional, las moléculas de DNA digeridas dan lugar a los patrones básicos que se muestran en la Figura 4B. Si el fragmento analizado no contiene un origen de replicación y, por tanto, es replicado por una horquilla que entra por un extremo, recorre el fragmento y sale por el otro extremo, adquiere la forma de Y. El patrón que generan el conjunto de fragmentos replicados de esta forma se denomina arco de Y simples (Figura 4B, en color verde). En la Figura 4B la señal 1,0x corresponde al fragmento de DNA lineal no replicado. El arco de Y simples parte de este punto y termina en el 2,0x, correspondiente a las moléculas completamente replicadas, situado también sobre el arco de lineales y cuya masa es el doble de la del fragmento no replicado. El punto de inflexión del arco de Y simple indica el sitio donde migran las moléculas que han sido replicadas al 50%, es decir 1,5 veces (1,5x) de su masa. Estas moléculas son las más complejas, con tres brazos iguales en longitud, por lo que su movilidad en segunda dimensión es menor.

Cuando el fragmento en estudio es replicado por dos horquillas que entran a la vez por los extremos y progresan a la misma velocidad y en direcciones opuestas, el encuentro de las mismas se produce en el centro del fragmento, obteniéndose la forma de una X. El patrón que se observa en las inmunodetecciones se denomina arco de Y dobles (Figura 4B, en color morado). Este patrón describe una línea recta inclinada que parte de la señal 1,0x y termina sobre el arco de recombinantes (cuyas características se describen más adelante).

Cuando el fragmento en estudio contiene un origen de replicación bidireccional que se encuentra situado en el centro del fragmento, el movimiento de las horquillas hacia ambos lados genera RIs con una burbuja interna cuyo tamaño aumenta a medida que el fragmento es replicado. El patrón que se observa en la inmunodetección es un arco de burbujas (Figura 4B, en color rojo), el cual tiene un origen en el 1,0x y nunca regresa al arco de lineales, con una inflexión característica hacia el final de la curva. Esto se debe a que cuando la masa de los RIs con una burbuja interna se aproxima al 2,0x su estructura se hace menos compleja lo que provoca un ligero aumento de su movilidad electroforética. En el caso de que el origen de replicación no se encuentre en el centro, el patrón esperado es mixto, burbuja e Y simples, y variará en función de la posición en la que se localice el origen.

Como ya se mencionó al principio del presente apartado, mediante geles bidimensionales podemos analizar, además de los RIs, las señales correspondientes a los RcIs. La señal correspondiente al arco de recombinantes (Figura 4B, en color azul) se observa como una línea recta ligeramente inclinada que parte de la señal del 2,0x situada sobre el arco de lineales. Está constituida por moléculas con una masa 2,0x que presentan distinta movilidad electroforética durante la segunda dimensión en función del sitio donde se haya producido la recombinación. El RcI que presenta menor movilidad (el más complejo) es aquel en el que la recombinación se ha producido en el centro de los dos fragmentos recombinantes. Esta molécula está formada por cuatro brazos de igual longitud. En cambio, el RcI que presenta más movilidad (el más sencillo) es aquél en el que la recombinación ha tenido lugar en uno de los extremos de los dos fragmentos (Bell and Byers, 1983). Esta molécula es casi lineal y migra prácticamente sobre el arco de lineales.

También se pueden detectar barreras para el progreso de las horquillas de replicación. La existencia de una barrera de replicación dentro del fragmento analizado implica la acumulación de un RI porcentualmente más representado que el resto en la población. Como consecuencia, la barrera se detecta como una señal puntual de mayor intensidad sobre el arco correspondiente.

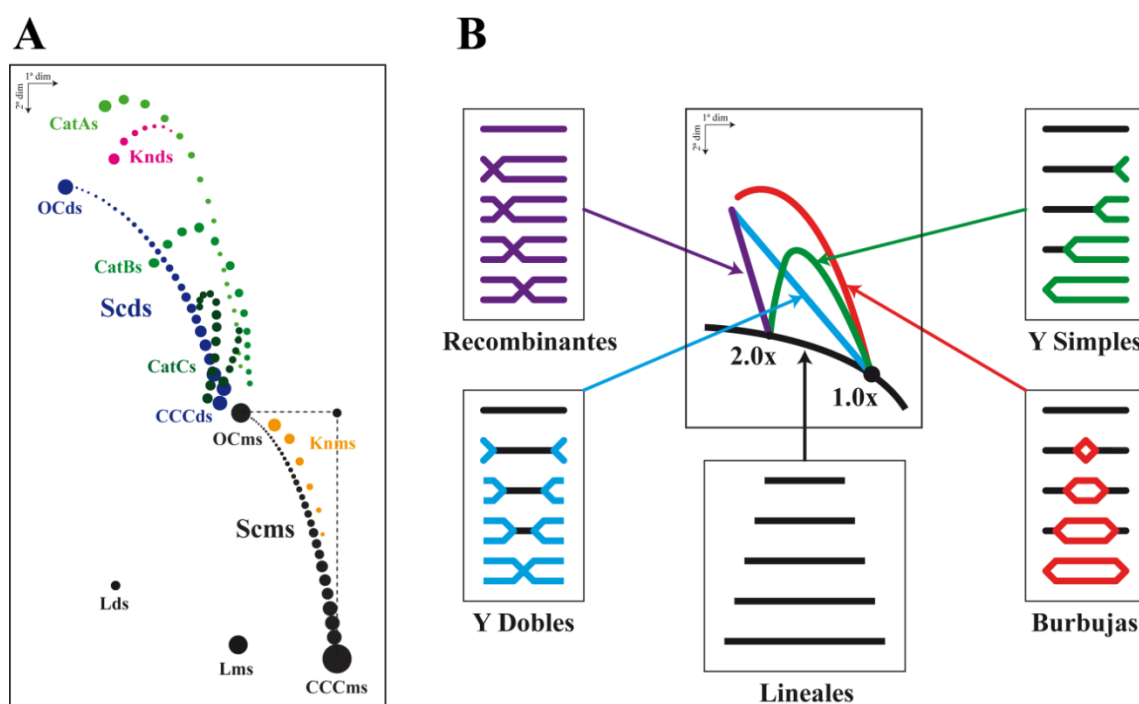


Figura 4. Esquemas de los patrones de hibridación generados por topoisómeros de moléculas circulares de DNA intactas (A) y por RIs lineales (B) al analizarlos por electroforesis bidimensional. **A:** En color negro se representan los monómeros superenrollados (Scms) y los lineales de monómeros y dímeros (Lms y Lds). En color azul se representan los dímeros superenrollados (Scds). En color verde se ilustran las tres poblaciones de moléculas encadenadas (CatAs, CatBs y CatCs). En color naranja se muestran los monómeros anudados (Knms) y en color magenta los dímeros anudados (Knds). **B:** En color rojo se muestra el arco de burbujas resultante cuando los fragmentos son replicados a partir de un origen bidireccional situado en posición central. En color verde se ilustra el arco de Y simples generado cuando el origen de replicación se encuentra fuera del fragmento analizado y éste es replicado por una horquilla que recorre el fragmento de un extremo al otro. En azul se representa el arco de Y dobles que tiene lugar cuando el fragmento es replicado por dos horquillas que entran simultáneamente por los dos extremos, progresan a la misma velocidad y se encuentran en el centro del fragmento. En color morado se representa el arco de recombinantes y en negro el arco formado por las moléculas lineales no replicadas de diferentes tamaños.

1.9. Algunos problemas no resueltos de la topología del DNA

La electroforesis bidimensional en geles de agarosa es la única que permite la identificación simultánea de todos los topoisómeros de una población (Martin-Parras et

al., 1998). Con esta técnica son distinguibles moléculas superenrolladas, encadenadas y anudadas. Para moléculas CCCs los cambios graduales en su movilidad electroforética dependen de los cambios en su Lk. Para las moléculas encadenadas tipo CatAs, su movilidad es consecuencia de su encadenamiento (Ca). Para las moléculas anudadas, su movilidad electroforética depende de los diferentes tipos de nudos que presentan. Todavía no se ha profundizado en las condiciones de electroforesis bidimensional idóneas para la separación simultánea de estas tres familias de moléculas.

En procariotas, se producen cambios en el nivel de superenrollamiento como consecuencia del avance de la maquinaria de replicación. Que dichos cambios afecten tanto a la región no replicada como a la ya replicada depende de si las horquillas pueden girar o no *in vivo*. Este aspecto de la topología sigue actualmente, sujeto a debate.

En eucariotas, los YACs lineales de pequeño tamaño aparecen como una única banda cuando se separan por electroforesis (Szostak and Blackburn, 1982). La causa es que no albergan superenrollamiento. Por un lado, se ha demostrado que la tensión helicoidal en el DNA puede disiparse a través de los telómeros *in vivo* indicando que los telómeros son estructuras topológicamente abiertas (Joshi et al., 2010). Por otro lado, el estrés torsional que se produce durante la replicación es dependiente del tamaño del cromosoma (Kegel et al., 2011). Por lo tanto, aunque las topoisomerasas son esenciales durante la replicación y transcripción del DNA (Brill and Sternglanz, 1988), es posible que los minicromosomas lineales no necesiten topoisomerasas para replicar ni segregar.

Estos son algunos de los problemas que nos hemos propuesto resolver en la presente Tesis Doctoral. Para ello, en el caso de moléculas con complejidad diferente, utilizaremos topoisómeros de la misma masa molecular pero que difieren en el tipo de sus cruces; presentan superenrollamiento, encadenamiento o anudamiento. Para identificar el papel del voltaje y la concentración de agarosa en la movilidad electroforética de estas tres familias de topoisómeros variaremos las condiciones de la segunda dimensión de las electroforesis. De esta forma, podremos establecer cuáles son las condiciones óptimas para su separación.

En el caso de procariotas, decidimos estudiar la topología de los RIs utilizando plásmidos de replicación autónoma derivados de pBR322 en los que las horquillas se detienen en un sitio concreto. En estos plásmidos, la replicación se inicia en el origen unidireccional ColE1 y la horquilla se detiene debido a la presencia de una secuencia terminadora de la replicación *Ter* de *E. coli*, *TerE* en nuestro caso, en la orientación adecuada. La proteína Tus (de *Terminator utilization substance*) se une a las secuencias *Ter* en forma monomérica y los complejos *Ter*-Tus actúan como barreras polares para el progreso de las horquillas de replicación (Hill, 1992; Kobayashi et al., 1989). Así pues, en las células se acumulan plásmidos parcialmente replicados. Además, utilizamos dos estirpes de *E. coli* para crecer y aislar nuestros plásmidos, una de ellas silvestre (DH5 α F') y otra que tiene una mutación termosensible para la Topo IV (parE10), de forma que esta enzima se inhibe al crecer las bacterias a la temperatura restrictiva. Para conocer las propiedades topológicas de los plásmidos e indagar sobre si las horquillas pueden o no girar *in vivo* permitiendo la formación de pre-encadenados conforme avanza la replicación, utilizamos la electroforesis bidimensional en geles de agarosa con o sin cloroquina (Chl). La Chl es un agente intercalante, una molécula de pequeño tamaño que se intercala entre las dos cadenas de la doble hélice del DNA, provocando un desenrollamiento parcial de las dos hebras de la molécula en el sitio que se intercala. De esta forma, se consigue mejorar la resolución de los topoisómeros de una población con alta densidad de superenrollamiento.

En cuanto a eucariotas, para analizar la replicación y segregación de YACs, empleamos como modelo dos minicromosomas derivados de pRS316 en *S. cerevisiae*: uno en forma circular y otro en forma lineal. Los minicromosomas son moléculas extracromosómicas de DNA circular de pequeño tamaño que se comportan como el DNA cromosómico, tanto a nivel físico (empaquetamiento nucleosomal y unión de cohesinas), bioquímico (interacción con proteínas reguladoras) y biológico (procesos metabólicos tales como replicación, transcripción, reparación y recombinación). Estas características hacen que los minicromosomas se utilicen muy a menudo como modelos para el estudio de procesos complejos. Además, empleando una estirpe de *S. cerevisiae* con un sistema degrón inducible por temperatura (Dohmen et al., 1994) podremos analizar las consecuencias de la eliminación de la Topo 2 en la replicación y segregación de nuestros minicromosomas.

2. OBJETIVOS

1. Determinar el papel del voltaje y la concentración de agarosa en la movilidad electroforética de topoisómeros superenrollados, encadenados y anudados de igual masa.
2. Optimizar la separación de poblaciones de topoisómeros de DNA que difieren en su grado de superenrollamiento, encadenamiento y anudamiento.
3. Identificar posibles diferencias en la topología de los RIs de plásmidos bacterianos de replicación autónoma con las horquillas detenidas en distintos puntos y aislados de células de *E. coli* con la Topo IV activa (estirpe DH5 α F') e inactiva (estirpe parE10).
5. Construir cromosomas artificiales de levaduras (YACs) de pequeño tamaño con estructura circular y lineal.
6. Estudiar los patrones de replicación y segregación de los YACs circulares y lineales en *S. cerevisiae*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material biológico

Las estirpes de *E. coli* utilizadas fueron:

DH5 α F': F'/ *endA1 hsdR17* ($r_k^- m_k^+$) *supE44 thi-1 λ^- recA1 gyrA96* (*Nal^r*) *relA1 deoR Δ (lacZYA-argF)-U169 ϕ 80dlacZ Δ M15*. Cedida por el Dr. Santiago Rodríguez de Córdoba.

parE10: W3110 F- excepto [*parE10 recA*]. Cedida por el Dr. Ian Grainge (Kato et al., 1990).

LZ38: F- λ (*P80 red114 xis-1 cl857*) *zei-723::Tn10 parC^{K84}, kan^R*. Cedida por la Dra. Lynn Zechiedrich (Zechiedrich et al., 1997).

Para el estudio del papel de la Topo 2 la estirpe de *S. cerevisiae* utilizada fue la Y1818 ó top2-td. Esta estirpe, que proviene de la YST114, está modificada para usarla con el degrón inducible por temperatura (Diffley, 2004; Dohmen et al., 1994; Tanaka and Diffley, 2002). Estas estirpes fueron cedidas por Jonathan Baxter. El genotipo se detalla a continuación:

W303-1a: MATa *ade2-1 ura 3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3 can1-100*

YST114: W303-1a *ubr1 Δ ::GAL1, 10p-Myc-UBR1::HIS3 leu2::pCM244 x3*

Y1818 (top2-td): YST114 *kanMX-tTA-tetO2-UB-DHFRts-myc-top2*

3.2. Medios de cultivo

3.2.1. Medios y cultivo de *E. coli*

Los cultivos en medio líquido de las estirpes bacterianas utilizadas se realizaron en LB (triptona 1%, extracto de levadura 0,5% y cloruro sódico 1%, pH 7,5) con agitación

orbital (250 rpm) a 30 °C en el caso de células *parE* y a 37 °C en el caso de células DH5 α F' y LZ38. Para la selección de transformantes se utilizó ampicilina a una concentración de 75 μ g/ml.

La inhibición de la Topo IV en las estirpes *parE10* (con mutación termosensible en el gen *parE*) se realizó creciendo el cultivo a la temperatura permisiva (30 °C) hasta alcanzar la fase exponencial e incubándolo después a la temperatura restrictiva (43 °C) durante 1 hora y con agitación orbital (250 rpm).

Para inhibir la DNA girasa y la Topo IV *in vivo* se crecieron los cultivos hasta que alcanzaron la fase exponencial y, a continuación, se añadió norfloxacin a una concentración de 15 ó 150 μ M y se incubaron durante 15-30 minutos con agitación orbital (250 rpm).

La densidad celular en los cultivos se determinó midiendo la densidad óptica en un espectrofotómetro a 600 nm (OD₆₀₀) frente a un blanco que contenía medio LB sin células bacterianas.

Los cultivos en medio sólido se realizaron en placa de Petri de 9 cm de diámetro con medio LB al que se le añadió agar (Pronadisa) al 2%. Las placas se incubaron invertidas en estufa a 30 °C ó 37 °C de 16 a 18 horas.

Todas las estirpes bacterianas se conservaron diluidas al 50% en una solución de glicerol (glicerol 65%, MgSO₄ 0,1 M, Tris-HCl 0,025 M, pH 8,0) a -20 °C y a -80 °C.

3.2.2. Medios y cultivo de *S. cerevisiae*

Los cultivos en medio líquido se crecieron en agitación orbital (250 rpm) a 25 °C. Para crecer las células sin transformar y para sincronizarlas cuando sí portaban los minicromosomas se utilizó el medio completo YPAR (extracto de levadura 1%, bactopectona 2%, adenina 60 mg/ml, rafinosa 2%, pH 5,6). Para la selección de la auxotrofia de las células transformadas con los minicromosomas se usó un medio selectivo

sin uracilo (Ura⁻): bases nitrogenadas de levaduras sin aminoácidos 0,7%, mezcla de aminoácidos a excepción de uracilo, rafinosa 2%, pH 4,5.

Los cultivos en medio sólido se realizaron en placas de Petri de 9 cm de diámetro con el medio correspondiente al que se le añadió agar (Pronadisa) al 2%. Las placas se incubaron invertidas entre 2 y 4 días en una estufa a 25 °C.

3.2.1.1. Sincronización de los cultivos de *S. cerevisiae*

La sincronización de los cultivos en crecimiento exponencial se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito por Breeden (Breeden, 1997) incluyendo algunas modificaciones.

Las células de la estirpe de *S. cerevisiae* top2-td son haploides del tipo sexual a y, por tanto, con una respuesta normal a la feromona α -factor (Trp-His-Trp-Leu-Gln-Leu-Lys-Pro-Gly-Gln-Pro-Met-Tyr) que provoca una parada en la fase G1 del ciclo celular. En las células, esta parada en G1 provoca una morfología de tipo *shmoo* (células sin gema, alargadas y con el núcleo también alargado), detectable por microscopía óptica (Pruyne and Bretscher, 2000).

Para la sincronización del cultivo, las células de la estirpe top2-td se crecieron en medio selectivo Ura⁻ y rafinosa 2% para mantener la selección del minicromosoma, en agitación orbital (250 rpm) a 25 °C. Seguidamente, las células se diluyeron en medio completo YPAR y se dejaron crecer hasta alcanzar la fase exponencial (aproximadamente 1×10^7 células/ml). En este punto, las células se detuvieron en fase G1 añadiendo α -factor (síntesis en el servicio de Química de proteínas en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC)) al cultivo a una concentración final de 10 µg/ml. Tras 150-180 minutos de incubación, se comprobó en el microscopio óptico que más del 90% de las células presentaban morfología *shmoo*, característica del bloqueo en G1 provocado por α -factor. Las células se liberaron del bloqueo con 4 lavados con medio de cultivo completo YPAR (centrifugando 2 minutos a 4.000 rpm) y se colocaron en un matraz para su crecimiento. Las células se recogieron, aproximadamente 1×10^9 células/pellet, a los 40 y 80 minutos

(tomando el tiempo 0 como el momento del primer lavado) añadiendo azida sódica al 0,1% y centrifugando a 4.000 rpm durante 5 minutos a 4° C. Finalmente, se realizaron dos lavados con agua destilada estéril fría centrifugando en las mismas condiciones.

Para la inhibición de la Topo 2 en los cultivos de *S. cerevisiae*, se comenzó creciendo el cultivo de la misma forma que para la sincronización hasta la adición del α -factor. Después de 100-120 minutos desde que se añadió α -factor se comprobó en el microscopio óptico que más del 50% de las células presentaban morfología *shmoo*. A continuación, se añadió galactosa 2% para expresar la ubiquitina ligasa, la cual ubiquitina a la Topo 2 fusionada con el degrón. A los 30-45 minutos se confirmó que, al menos, el 90% de las células presentaban morfología *shmoo* y se añadió doxiciclina (Sigma) a una concentración final de 50 μ g/ml para reprimir el promotor del gen Topo 2. A los 30 minutos, se pasó el cultivo a la temperatura restrictiva de 37 °C durante 1 hora y media para inducir el degrón, de forma que la Topo 2 se ubiquitina y es degradada por el proteosoma. Tras ese tiempo, las células se liberaron del bloqueo lavándolas cuatro veces con medio de cultivo completo YPAR con galactosa y doxiciclina atemperado a 37 °C (centrifugando 2 minutos a 4.000 rpm). Se recogieron aproximadamente 1×10^9 células/pellet en el minuto 40 y 80 (tomando el tiempo 0 como el momento del primer lavado) añadiendo azida sódica al 0,1% y centrifugando a 4.000 rpm, durante 5 minutos a 4 °C. Finalmente, se lavaron los pellets con agua destilada estéril fría centrifugando en las mismas condiciones. Además, se recogieron alícuotas de 500 μ L de cultivo cada 20 minutos para su posterior análisis mediante citometría de flujo.

3.3. Preparación de células de *S. cerevisiae* para su análisis mediante citometría de flujo

Las muestras se recogieron y procesaron siguiendo el protocolo de Labib y colaboradores (Labib et al., 1999) con algunas modificaciones.

Se tomaron alícuotas de 10^7 células, se centrifugaron, se fijaron en 1 ml de etanol al 70% y se guardaron a 4 °C. Posteriormente, 200 μ l de las células fijadas se lavaron 2 veces con tampón citrato sódico 50 mM para su rehidratación. Se resuspendieron en 500

µl de tampón citrato sódico 50 mM con RNasa (Sigma) 200 µg/ml y se incubaron a 37 °C durante 2 horas. Tras este tratamiento, se añadió un volumen de tampón citrato sódico 50 mM con SYTOX®Green (Molecular Probes) a una concentración de 0,2 µM, quedando éste a una concentración final de 0,1 µM. Las muestras se sonicaron durante 15 segundos a una potencia del 35% y se analizaron en el servicio de Citometría de flujo del CIB-CSIC en un citómetro EPICS XL (Beckman Coulter); los datos se procesaron con el *software* FlowJo 8.7.

3.4. Plásmidos y minicromosomas

pBR18 (4383 pb): es un derivado de pBR322 (Bolivar et al., 1977) en donde el promotor del gen de resistencia a tetraciclina fue sustituido por la región *polylinker* de pUC18 (Santamaria et al., 2000a). Este plásmido, en su forma monomérica (4383 pb) y dimerica (8766 pb), se ilustra en la Figura 5 y fue utilizado para estudiar la movilidad electroforética de moléculas superenrolladas, encadenadas y anudadas.

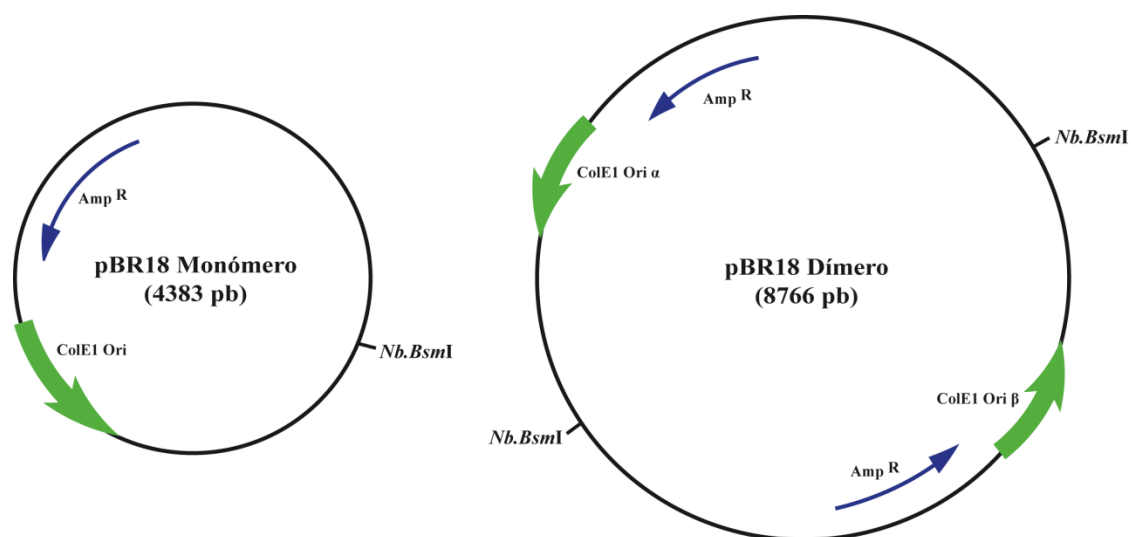


Figura 5. Mapas del plásmido pBR18. Sobre los mapas se indica la posición y orientación del origen unidireccional de replicación ColE1 (en color verde), y del gen que confiere resistencia a ampicilina (en color azul). El sitio de corte de la enzima de restricción de cadena sencilla *Nb.BsmI* aparece señalado en el exterior de los mapas. **A:** Monómero. **B:** Dímero.

pBR-TerE@*StyI* (4385 pb): es un derivado de pBR322-TerE@*StyI* (Olavarrieta et al., 2002a) construido por V. López y M.L. Martínez-Robles (Lopez et al., 2012). Contiene la secuencia terminadora de la replicación *TerE* del cromosoma de *E. coli* entre los sitios *StyI* y *AvaI* de pBR322, en la orientación adecuada para bloquear el progreso de las horquillas de replicación que se inician en el origen unidireccional ColE1 del plásmido (Figura 6A). Esta estrategia permite obtener un número significativo de RIs con la horquilla de replicación detenida en la secuencia *TerE*, cuando ha alcanzado el 26% de su replicación. De este modo los RIs acumulados contienen una burbuja interna y su masa es 1,26 veces la masa del plásmido no replicado, tal y como se muestra en la Figura 6B y C.

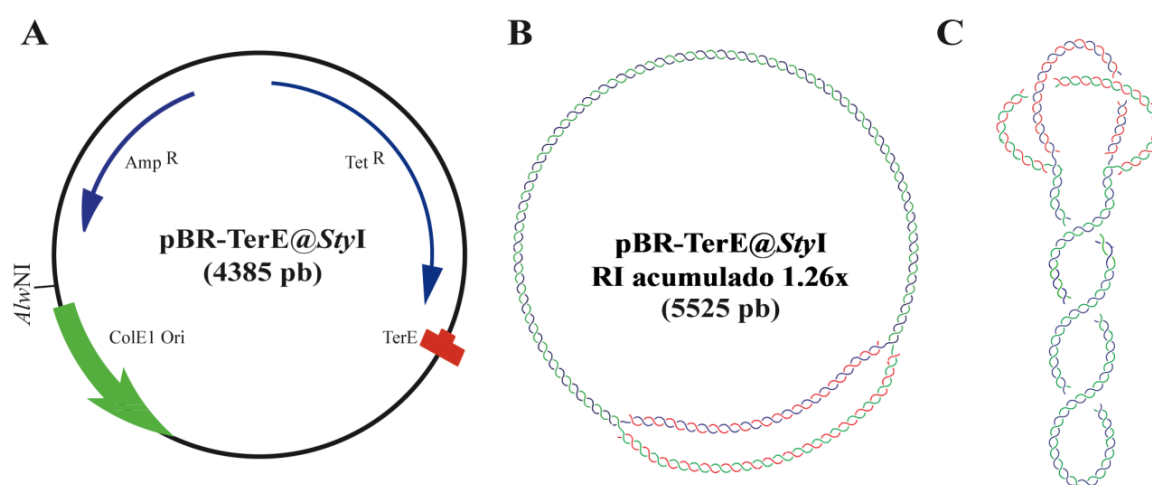


Figura 6. Mapa del plásmido pBR-TerE@*StyI*. **A:** Mapa del plásmido en donde se indica la posición y orientación del origen ColE1 (en color verde), del terminador polar de la replicación *TerE* (en color rojo) y de los genes que confieren resistencia a ampicilina (flecha azul a la izquierda) y tetraciclina (flecha azul a la derecha). El sitio de corte de la enzima de restricción *A**l**w**N**I* aparece señalado sobre el mapa. **B y C:** Esquema del RI que se acumula cuando la horquilla de replicación se detiene al llegar a la secuencia *TerE* representado en estado relajado (**B**) y con un $\Delta LK = -4$ (**C**). La doble hélice parental se representa en azul y verde y las cadenas nacientes en rojo.

pBR-TerE@*AatII* (4449 pb): es un derivado de pBR322-TerE@*AatII* (Olavarrieta et al., 2002a) construido por V. López y M.L. Martínez-Robles (Lopez et al., 2012). Contiene la secuencia terminadora de la replicación *TerE* en el sitio *AatII* de pBR322 (Figura 7A). Debido a la posición del terminador respecto al origen, en este plásmido se acumulan RIs con la horquilla detenida cuando ha alcanzado el 60% de su replicación. Por tanto, los RIs acumulados contienen una burbuja interna y su masa es 1,60 veces la masa del plásmido no replicado (Figura 7B y C).

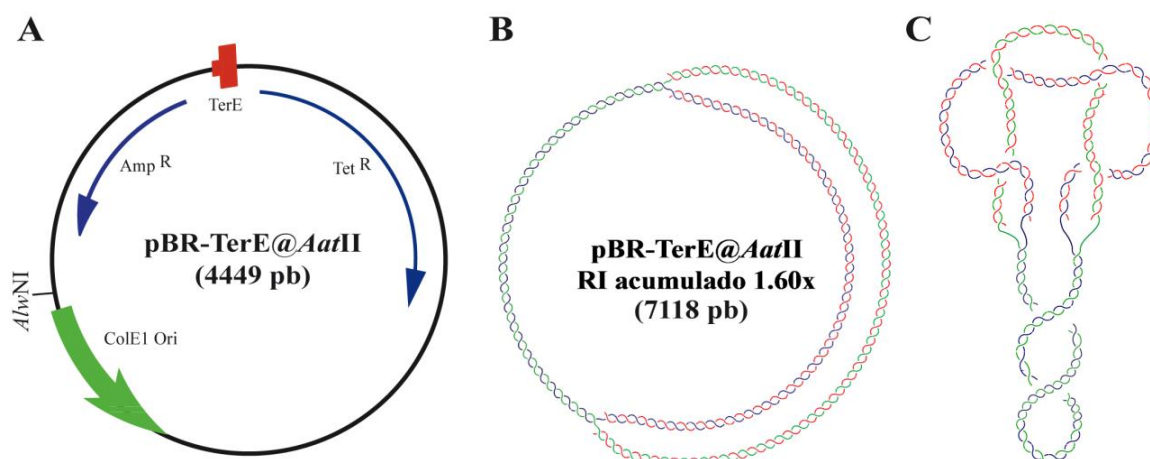


Figura 7. Mapa del plásmido pBR-TerE@AatII. **A:** Mapa del plásmido sobre el que se indica la posición y orientación del origen ColE1 (en color verde), del terminador polar de la replicación *TerE* (en color rojo) y de los genes que confieren resistencia a ampicilina (flecha azul a la izquierda) y tetraciclina (flecha azul a la derecha). El sitio de corte de la enzima de restricción *AatII* aparece señalado sobre el mapa. **B y C:** Esquema del RI que se acumula cuando la horquilla de replicación se detiene al llegar a la secuencia *TerE* representado en estado relajado (**B**) y con un $\Delta LK = -4$ (**C**). La doble hélice parental se representa en azul y verde y las cadenas nacientes en rojo.

pBR-TerE@DraI (4433 pb): es un derivado de pBR322-TerE@DraI (Olavarrieta et al., 2002a) construido por V. López y M.L. Martínez-Robles (Lopez et al., 2012). Contiene la secuencia terminadora de la replicación *TerE* en la orientación adecuada para bloquear el progreso de las horquillas de replicación que se inician en el origen unidireccional ColE1 del plásmido (Figura 8A). En este plásmido la horquilla se detiene cuando los RIs han alcanzado un 80% de su replicación; de manera que dichos RIs contienen una burbuja interna y su masa es 1,80 veces la masa del plásmido no replicado, tal y como se muestra en la Figura 8B y C.

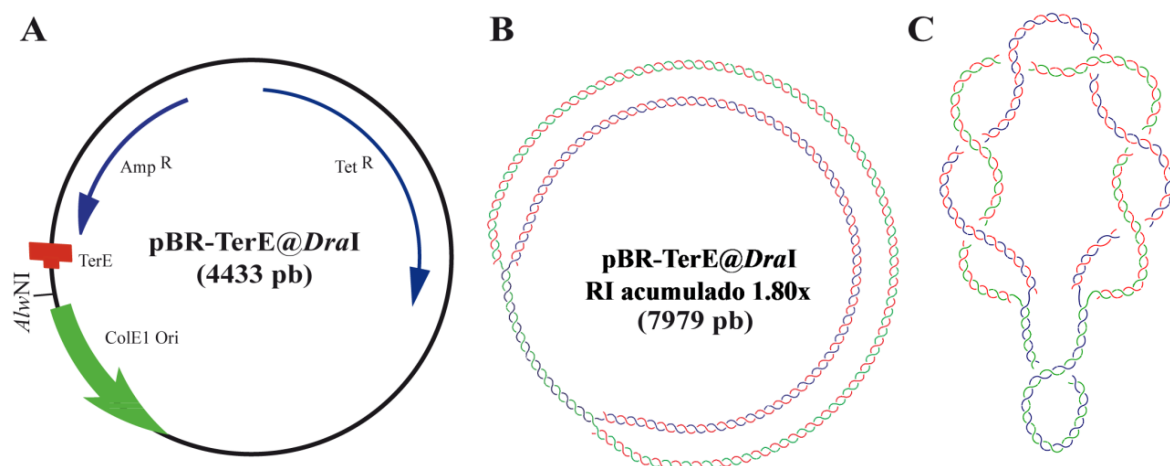


Figura 8. Mapa del plásmido pBR-TerE@DraI. **A:** Mapa del plásmido en el que se indica la posición y orientación del origen ColE1 (en color verde), del terminador polar de la replicación *TerE* (en color rojo) y de los genes que confieren resistencia a ampicilina (flecha azul a la izquierda) y tetraciclina (flecha azul a la derecha). El sitio de corte de la enzima de restricción *A/wNI* aparece señalado sobre el mapa. **B y C:** Esquema del RI que se acumula cuando la horquilla de replicación se detiene al llegar a la secuencia *TerE* representado en estado relajado (**B**) y con un $\Delta LK = -4$ (**C**). La doble hélice parental se representa en azul y verde y las cadenas nacientes en rojo.

Estos plásmidos con la secuencia de replicación *TerE* situada a diferentes distancias del origen ColE1 se utilizaron para transformar las estirpes DH5 α F' y parE10 de *E. coli* que cultivamos en presencia de ampicilina. De esos cultivos en crecimiento exponencial se extrajo el DNA plasmídico tal y como se describe en el apartado 3.8.1.1.

Minicromosoma pRS316 (4887 pb): es un plásmido replicativo de levadura derivado del plásmido integrativo pRS306 al que se le han añadido la secuencia centromérica CEN6 y el origen de replicación ARS4 (*Autonomous Replication Sequence*) para su estabilidad mitótica en *S. cerevisiae* (Sikorski and Hieter, 1989). En el sitio *NdeI* posee un inserto de 1112 pb que contiene el gen *URA3* (Figura 9).

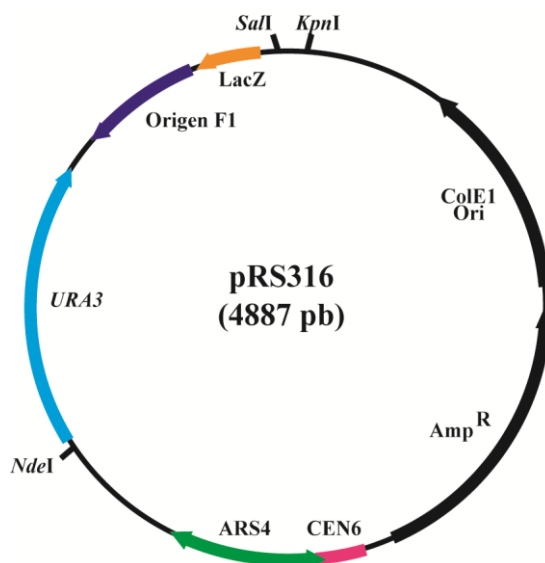


Figura 9. Mapa del minicromosoma pRS316. Esquema representativo en el que se detallan los elementos más importantes. En el interior se indican las posiciones y orientaciones de la secuencia de replicación autónoma (ARS4, en color verde) que funciona como origen para la replicación en levaduras, el centrómero (CEN6, en color magenta) que permite la segregación del plásmido durante la división celular de las levaduras, el origen de replicación en *E. coli* (ColE1 Ori, en color negro), el gen que confiere resistencia a ampicilina (Amp^R, color negro), el gen *URA3* (en color azul), el gen *LacZ* (en color naranja) y el origen F1 (en color morado). En el exterior se indican los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *KpnI*, *NdeI* y *SalI*.

Minicromosoma pRSF1MEM (5854 pb): es un derivado de pRS316 (Figura 9). Se añadieron dos secuencias del fago λ (Thermo Scientific) de 499 y 463 pb clonadas, respectivamente, entre los sitios *SalI* y *KpnI* de pRS316 para ser utilizadas como sondas (sonda L1 y L2). La sonda L1 se obtuvo mediante digestión enzimática del DNA del fago λ con la enzima *SalI* y se extrajo de un gel de agarosa con *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). La sonda L2 se obtuvo por PCR con oligonucleótidos a los que se les añadió colas con el sitio de reconocimiento de la enzima *KpnI* protegido por un triplete de Cs (Tabla 1). El producto de PCR se purificó con *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen).

Tabla 1. Pareja de oligonucleótidos utilizados para la realización de las PCR para la obtención de la sonda L2.

Nombre	Secuencia (5'-3')
<i>KpnI</i> Fwd	CCC <u>GGTACCA</u> AAAGCCAGAACTCCCCGTAT
<i>KpnI</i> Rev	CCC <u>GGTACCA</u> CCGTGACACCGGATATGTT

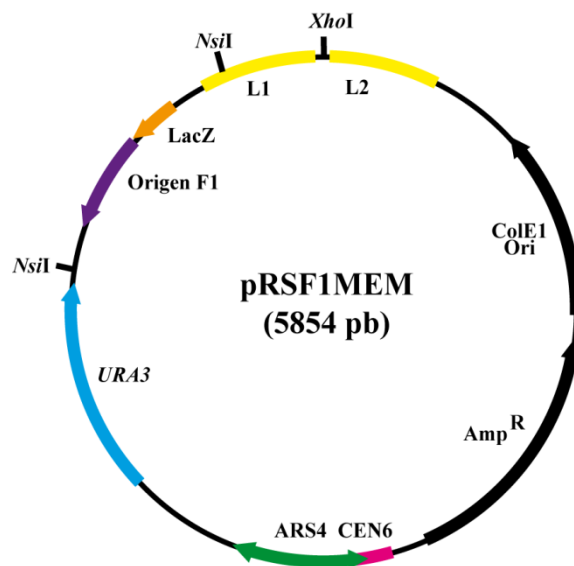


Figura 10. Mapa del minicromosoma pRSF1MEM. Esquema representativo en el que se detallan los elementos más importantes. En el interior se indican las posiciones y orientaciones de la secuencia de replicación autónoma (ARS4, en color verde) que funciona como origen para la replicación en levaduras, el centrómero (CEN6, en color magenta) que permite la segregación del plásmido durante la división celular de las levaduras, el origen de replicación en *E. coli* (ColE1 Ori, en color negro), el gen que confiere resistencia a ampicilina (Amp^R, color negro), el gen *URA3* (en color azul), el gen *LacZ* (en color naranja), el origen F1 (en color morado) y las dos secuencias derivadas del fago λ (L1 y L2, en color amarillo). En el exterior se indican los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *NsiI* y *XhoI*.

En ambas ligaciones el vector se desfosforiló en el extremo 5' con fosfatasa alcalina (Roche). Las reacciones de ligación se realizaron con una relación molar vector:inserto de 1:3 en presencia de 10 unidades de T4 DNA ligasa (Roche). Después de 16 horas de incubación a 4 °C se transformaron las células de la estirpe DH5 α F' de *E. coli* con la totalidad de la reacción.

Minicromosoma pRSMEM (4788 pb): derivado de pRSF1MEM (Figura 10). Se eliminó el origen F1 y el gen *LacZ* de pRSF1MEM mediante digestión enzimática con la enzima *NsiI*, perdiéndose parte de la secuencia de la sonda L1, la cual pasó a tener 273 pb. Después de la digestión se procedió a extraer en gel de agarosa con *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). Se ligaron los extremos del vector en un volumen pequeño (20 μ l) para favorecer la ligación intramolecular. La reacción se llevó a cabo durante 16 horas a 4 °C y se transformaron las células de la estirpe DH5 α F' de *E. coli* con la totalidad de la reacción (Figura 11).

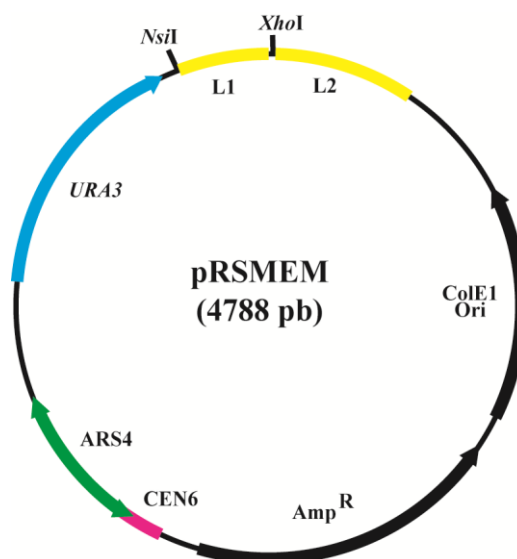


Figura 11. Mapa del minicromosoma pRSMEM. Esquema representativo en el que se detallan los elementos más importantes. En el interior se indican las posiciones y orientaciones de la secuencia de replicación autónoma (ARS4, en color verde) que funciona como origen para la replicación en levaduras, el centrómero (CEN6, en color magenta) que permite la segregación del plásmido durante la división celular de las levaduras, el origen de replicación en *E. coli* (ColE1 Ori, en color negro), el gen que confiere resistencia a ampicilina (Amp^R, color negro), el gen *URA3*, (en color azul), y las dos secuencias del fago λ (L1 y L2, en color amarillo). En el exterior se indican los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *NsiI* y *XhoI*.

Minicromosoma circular pYAC_MEM (7966 pb): es un derivado de pRSMEM (Figura 11). En pRSMEM se clonó, en el sitio *XhoI*, un fragmento de 3178 pb que contenía las secuencias teloméricas (TEL) de *Tetrahymena thermophila* (Shampay and Blackburn, 1989) separadas por una secuencia superior a 1 kb que contenía el gen de histidina (*HIS3*). Dicho fragmento se obtuvo mediante digestión enzimática con la enzima *XhoI* del cromosoma circular pYAC-RC (Marchuk and Collins, 1988). A continuación, se ligaron vector e inserto en una relación molar de 1:5 con 10 unidades de T4 DNA ligasa. La reacción se llevó a cabo durante 16 horas a 4 °C y se transformaron las células de la estirpe DH5 α F' de *E. coli* con la totalidad de la reacción (Figura 12).

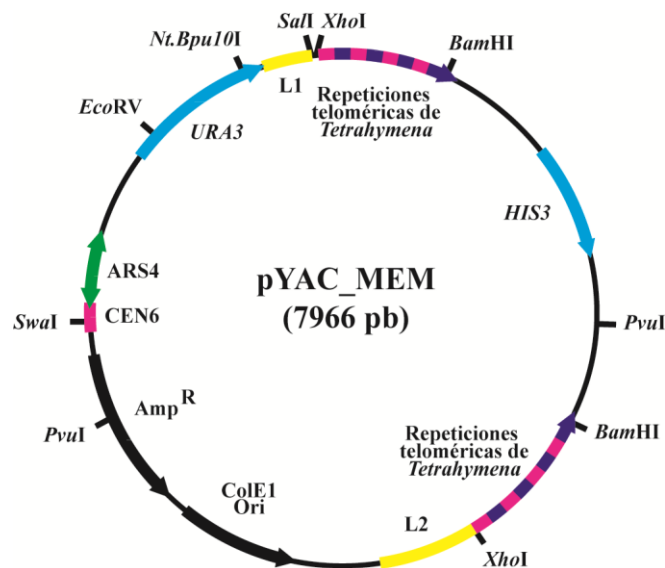


Figura 12. Mapa del minicromosoma pYAC_MEM. Esquema representativo en el que se detallan los elementos más importantes. En el interior se indican las posiciones y orientaciones de la secuencia de replicación autónoma (ARS4, en color verde) que funciona como origen para la replicación en levaduras, el centrómero (CEN6, en color magenta) que permite la segregación del plásmido durante la división celular de las levaduras, el origen de replicación en *E. coli* (ColE1 Ori, en color negro), el gen que confiere resistencia a ampicilina (Amp^R, color negro), los genes *URA3* e *HIS3* (en color azul), las dos secuencias teloméricas de *Tetrahymena thermophila* (en color magenta y morado) y las dos secuencias del fago λ (L1 y L2, en color amarillo). En el exterior se indican los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *Bam*HI, *Eco*RV, *Nt.Bpu*10I, *Pvu*I, *Sal*I, *Swa*I y *Xho*I.

Minicromosoma lineal YAC_MEM (6198pb): es un derivado de pYAC_MEM (Figura 12). pYAC_MEM se linearizó mediante digestión con la enzima de restricción *Bam*HI, dejando las secuencias TEL libres en los extremos. (Figura 13).

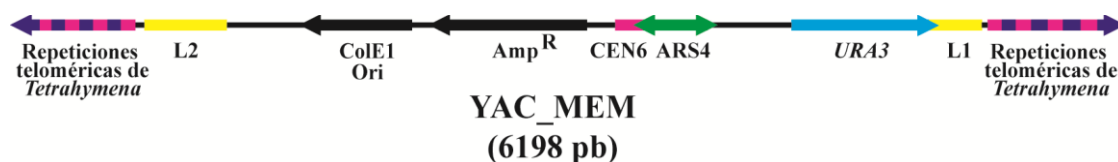


Figura 13. Mapa del minicromosoma YAC_MEM. Esquema representativo en el que se detallan los elementos más importantes. En la parte inferior se indican las posiciones y orientaciones de la secuencia de replicación autónoma (ARS4, en color verde) que funciona como origen para la replicación en levaduras, el centrómero (CEN6, en color magenta) que permite la segregación del plásmido durante la división celular de las levaduras, el origen de replicación en *E. coli* (ColE1 Ori, en color negro), el gen que confiere resistencia a ampicilina (Amp^R, color negro), el gen *URA3* (en color azul), las dos secuencias teloméricas de *Tetrahymena thermophila* (en color magenta y morado) y las dos secuencias del fago λ (L1 y L2, en color amarillo).

Minicromosoma circular pYAC_MEM_RFB+ (8908 pb): es un derivado de pBB6-RFB+ (Benguria et al., 2003; Brewer et al., 1992). pBB6-RFB+ se digirió con la enzima de restricción *EcoRI* para aislar el fragmento que contiene la barrera para la horquilla de replicación (RFB = *Replication Fork Barrier*). A continuación, este fragmento se insertó en el sitio *SaI* del cromosoma circular pYAC_MEM (Figura 12). El mapa de pYAC_MEM_RFB+ se ilustra en la Figura 14.

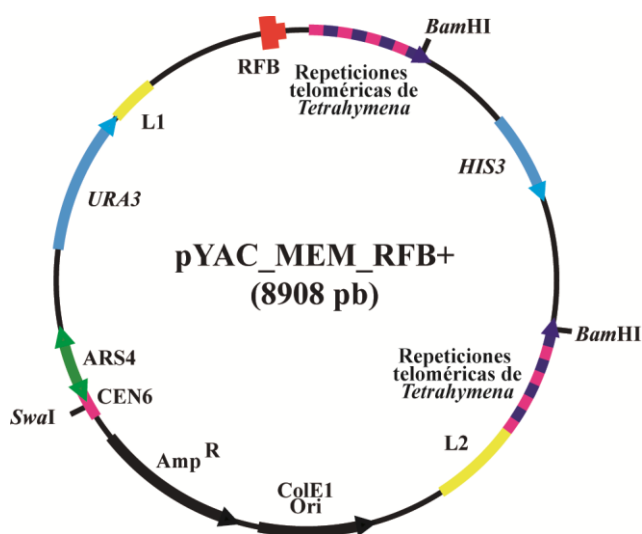


Figura 14. Mapa del minicromosoma pYAC_MEM_RBF+. Esquema representativo en el que se detallan los elementos más importantes. En el interior se indican las posiciones y orientaciones de la secuencia de replicación autónoma (ARS4, en color verde) que funciona como origen para la replicación en levaduras, el centrómero (CEN6, en color magenta) que permite la segregación del plásmido durante la división celular de las levaduras, el origen de replicación en *E. coli* (ColE1 Ori, en color negro), el gen que confiere resistencia a ampicilina (Amp^R, color negro), los genes *URA3* e *HIS3* (en color azul), las dos secuencias teloméricas de *Tetrahymena thermophila* (en color magenta y morado), las dos secuencias del fago λ (L1 y L2, en color amarillo) y la secuencia conteniendo la RFB (en color rojo). En el exterior se indican los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *BamHI*, *SwaI*.

Minicromosoma lineal YAC_MEM_RFB+ (7140 pb): derivado de pYAC_MEM_RFB+ (Figura 14), el cual se linearizó mediante digestión con la enzima de restricción *Bam*HI, dejando las secuencias TEL libres en los extremos. (Figura 15).

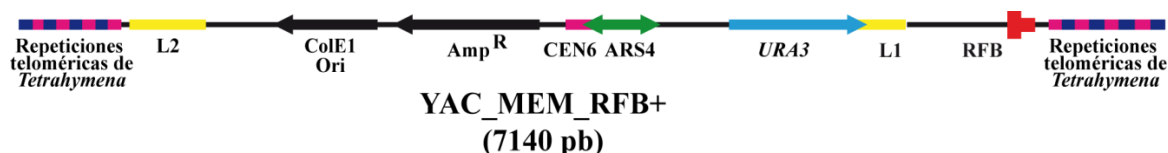


Figura 15. Mapa del minicromosoma YAC_MEM_RFB+. Esquema representativo en el que se detallan los elementos más importantes. En la parte inferior se indican las posiciones y orientaciones de la secuencia de replicación autónoma (ARS4, en color verde) que funciona como origen para la replicación en levaduras, el centrómero (CEN6, en color magenta) que permite la segregación del plásmido durante la división celular de las levaduras, el origen de replicación en *E. coli* (ColE1 Ori, en color negro), el gen que confiere resistencia a ampicilina (Amp^R, color negro), el gen *URA3* (en color azul), las dos secuencias teloméricas de *Tetrahymena thermophila* (en color magenta y morado), las dos secuencias del fago λ (L1 y L2, en color amarillo) y la secuencia conteniendo la RFB (en color rojo).

Todos los minicromosomas se construyeron en *E. coli* y pYACMEM, YACMEM, pYAC_MEM_RBF+ y YAC_MEM_RFB+ (Figuras 12, 13, 14 y 15, respectivamente) se utilizaron para transformar la estirpe top2-td de *S.cerevisiae* para estudiar su replicación y segregación.

3.5. Transformación de *E. coli*

La preparación de células de *E. coli* competentes y su posterior transformación se realizó siguiendo el procedimiento de choque térmico descrito por Hanahan (Hanahan, 1983).

3.6. Transformación de *S. cerevisiae*

La transformación de células de *S. cerevisiae* se realizó según el método de acetato de litio descrito por Ito y colaboradores (Ito et al., 1983).

3.7. Estudio de la estabilidad mitótica

El estudio de la estabilidad mitótica de los minicromosomas se realizó según el protocolo descrito por Panzeri (Panzeri and Philippsen, 1982). En primer lugar, las células con los minicromosomas se crecieron en placa con medio selectivo sin uracilo (Ura⁻). A continuación, se seleccionaron varias colonias y se cambiaron a medio líquido, de nuevo Ura⁻. Posteriormente, se pasaron a medio completo YPAR y después de 17 generaciones entre 1-200 células (previamente diluidas a 1 célula/μl) se sembraron en placas del mismo medio completo YPAR. Finalmente, el porcentaje de colonias Ura⁺ se determinó haciendo réplicas en placas con medio selectivo Ura⁻.

3.8. Extracción del DNA

3.8.1. Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*

3.8.1.1. Extracción total

La extracción a pequeña escala de DNA plasmídico de *E. coli* se realizó mediante el *Nucleo Spin Plasmid Kit* (Macherey-Nagel). Para la extracción a gran escala empleamos *JETstar Plasmid Purification MAXI Kit* (Genome).

3.8.1.2. Extracción de formas replicativas

La extracción de DNA plasmídico enriquecido en RIs se realizó a partir de cultivos de *E. coli* en crecimiento exponencial siguiendo el método descrito por Viguera y colaboradores (Viguera et al., 1996).

3.8.2. Extracción de DNA plasmídico de *S. cerevisiae*

3.8.2.1. Extracción total

Para la extracción rápida de DNA total de la estirpe top2-td de *S. cerevisiae* y su posterior análisis por *Southern blot* se utilizó el método desarrollado por Hoffman y colaboradores (Hoffman and Winston, 1987) introduciendo algunas modificaciones.

Se inocularon las colonias de las que se querían extraer los plásmidos en el medio selectivo apropiado y se recogieron por centrifugación (3.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente) 10-15 ml del cultivo saturado ($1,5 \times 10^8$ células/ml). Se lavaron las células con 0,5 ml de agua destilada estéril y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. A continuación, se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 200 μ l de tampón de rotura (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y EDTA 1 mM pH 8,0). Se añadieron 200 μ l de PCIA 25:24:1 (fenol: cloroformo: alcohol isoamílico) y 0,3 g de esferas de vidrio (0,5 mm de diámetro, Biospec). La mezcla se agitó en vórtex a máxima velocidad durante 2 minutos a 4 °C (4 períodos de 30 segundos con intervalos de 30 segundos en hielo). Seguidamente, se mezcló la emulsión con 200 μ l de TEN₁₀₀ (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y EDTA 1 mM pH 8,0) y se centrifugó en una microcentrífuga a máxima velocidad durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se añadieron otros 200 μ l de tampón de rotura. Se volvió a repetir el proceso de rotura con vórtex, a excepción de que no se añadió TEN₁₀₀. Para eliminar las proteínas se fenolizó añadiendo un volumen de PCIA 25:24:1 igual al obtenido al juntar las fases acuosas. Finalmente, se añadió un volumen de CIA 24:1. Posteriormente, se precipitó el DNA con 1 ml de etanol frío al 100%, se centrifugó a 14.500 rpm durante 30 minutos a 4 °C y se resuspendió en 30 μ l de agua destilada estéril. El volumen correspondiente a 5×10^9 células fue digerido con enzimas de restricción para su análisis por *Southern*.

3.8.2.2. Extracción de formas replicativas

El protocolo utilizado para la extracción de formas replicativas de DNA en *S. cerevisiae* está basado en el descrito por Huberman y colaboradores (Huberman et al., 1987) con algunas modificaciones.

Los cultivos de las estirpes a estudiar se crecieron hasta una concentración de 1×10^9 células/ml y se detuvieron con azida sódica al 0.1%. Las células se recogieron por centrifugación a 3.000 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente y se lavaron 2 veces con agua estéril fría centrifugando a 3.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. A continuación, las células se resuspendieron en solución de NIB frío (*Nuclear isolation buffer*; glicerol 17%, MOPS 50 mM, acetato de potasio 150 mM, cloruro de magnesio 2 mM, espermidina 500 μ M y espermina 150 μ M, pH 7,2). La rotura mecánica de la pared celular se realizó en cámara fría añadiendo a las células en suspensión un volumen igual de esferas de vidrio (0.5 mm de diámetro, Biospec) y alternando períodos de 30 segundos en vórtex a máxima velocidad y de reposo en hielo. Se comprobó la rotura de la pared celular con un microscopio óptico. Cuando, aproximadamente, un 90% de las células presentaban su pared rota, se dejaron depositar las esferas en el fondo del tubo por gravedad y se recogió el sobrenadante con los protoplastos. Las esferas de vidrio se lavaron 2 veces más con dos volúmenes de NIB frío. Estos lavados se juntaron al sobrenadante original y los protoplastos se recogieron por centrifugación a 8.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Seguidamente se lisaron las células incubándolas durante 1 hora a 37 °C en 500 μ l de TEN₅₀₋₅₀₋₁₀₀ (Tris-HCl 50 mM, EDTA 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0) conteniendo Sarkosyl NL-30 (Sigma) al 1,5% y proteinasa K (Palladino et al.) a 300 μ g/ml. Después de la incubación se centrifugó a 5.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y se recogió el sobrenadante. Para la eliminación de las proteínas se trató con un volumen de PCIA 25:24:1 varias veces (hasta que desapareció la interfase de color blanquecino) y una vez con CIA 24:1. El DNA se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol 100% frío durante al menos 16 horas a -20 °C. Se centrifugó a 9.000 rpm durante 1 hora a 4 °C. Se lavó con etanol 70% frío y se centrifugó en las mismas condiciones 30 minutos. Finalmente, se dejó secar al pellet y se resuspendió a una concentración final de 3×10^7 células/ μ l en agua destilada estéril durante, al menos, 16 horas a 4 °C.

3.9. Digestiones enzimáticas

3.9.1. Digestiones enzimáticas con endonucleasas de restricción de cadena sencilla

Las digestiones totales de las formas replicativas de DNA de los minicromosomas circulares y lineales en *S. cerevisiae* se realizaron con la endonucleasa de restricción de cadena sencilla *Nt.Bpu10I* (Thermo Scientific) durante 1 hora a 37 °C. Las digestiones totales de las formas replicativas de DNA del plásmido pBR18 se realizaron con la enzima *Nb.BsmI* (New England Biolabs) durante 2 horas a 50 °C.

3.9.2. Digestiones enzimáticas con endonucleasas de restricción de doble cadena

Las digestiones totales con las enzimas de restricción *AlwNI*, *BamHI*, *EcoRV*, *KpnI*, *NsiI*, *PvuI*, *PvuII*, *SalI*, *SwaI* y *XhoI* (New England Biolabs) se llevaron a cabo durante 1-3 horas a 37 °C, a excepción de *SwaI* (New England Biolabs) cuya temperatura de incubación fue a 25 °C.

3.10. Análisis de DNA

3.10.1. Electroforesis en geles de agarosa

3.10.1.1. Electroforesis unidimensional

La electroforesis unidimensional se realizó en geles de agarosa (Pronadisa) a distintas concentraciones dependiendo del tamaño de las moléculas a analizar y utilizando como tampón TBE 1x. Como marcador de pesos moleculares se utilizó MassRuler (Thermo Scientific) o DNA del bacteriófago λ digerido con *HindIII* (Thermo Scientific). A las muestras se les añadió, previamente a su carga en el gel, 1/10 de volumen de tampón de carga bicolor.

Los geles se tiñeron en una solución de EthBr (Sigma) a una concentración de 1 µg/ml y se visualizaron con un transiluminador de luz ultravioleta de 302 nm de longitud de onda (*Gel Doc 2000*, Bio-Rad).

3.10.1.2. Electroforesis bidimensional neutra-neutra

El análisis del DNA por electroforesis bidimensional en geles de agarosa (Seakem® LE, Lonza) se realizó siguiendo el protocolo descrito originariamente por Brewer y Fangman (Brewer and Fangman, 1988) ligeramente modificado de acuerdo al tamaño de las moléculas según se trate de formas intactas o digeridas.

3.10.1.2.1. Electroforesis bidimensional de formas intactas

En todos los estudios la primera dimensión se llevó a cabo a temperatura ambiente. En cambio, la concentración de agarosa, el voltaje y la temperatura fueron diferentes según el estudio. Para el análisis de la movilidad electroforética de las diferentes familias de topoisómeros y de los RIs de plásmidos bacterianos la concentración de los geles fue de 0,4% de agarosa (Seakem® LE, Lonza) en TBE 1x y se corrió a 1 V/cm durante 25-30 horas. Para analizar los minicromosomas circulares y lineales (6,5-8 Kb) la primera dimensión se realizó en geles a una concentración de 0,35% de agarosa en TBE 1x y se corrió a 1 V/cm durante 35-38 horas.

Las condiciones de la segunda dimensión también variaron según el material con el que se trabajó, pero en todos los casos se llevó a cabo a 4 °C. Para el estudio de las diferentes familias de topoisómeros las condiciones fueron: 0,8-1,2% y 5-6,6 V/cm, 8-22 horas. Para el análisis de los RIs de pBR-*TerE* con las horquillas detenidas a distintas distancias del origen de replicación las condiciones fueron de 1% de agarosa en TBE 1x, 5 V/cm y 10 horas. Además, en los casos indicados, se añadió Chl (Sigma), tanto en el gel de agarosa como en el tampón TBE 1x, a una concentración de 5 µg/ml. El estudio de los minicromosomas circulares y lineales se desarrolló en geles de agarosa de 0,8-0,9% y se corrió a 5 V/cm durante 12-14 horas.

3.10.1.2.1. Electroforesis bidimensional de formas digeridas

Para analizar los fragmentos obtenidos tras la digestión con *AlwNI* de los plásmidos con la horquilla detenida a diferentes distancias del origen de replicación, en la primera dimensión se utilizaron geles a una concentración de 0,4% de agarosa y se corrieron a 1 V/cm durante 22 horas a temperatura ambiente. La segunda dimensión se realizó en geles a una concentración de agarosa del 1% y se corrieron a 5 V/cm durante 8 horas a 4 °C en presencia de 0,3 µg/ml de EthBr.

Para analizar los fragmentos obtenidos tras la digestión con diferentes endonucleasas de restricción de los minicromosomas de *S. cerevisiae* las condiciones de primera y segunda dimensión difirieron según el tamaño de los fragmentos a estudiar. Así, la primera dimensión para fragmentos de un tamaño comprendido entre 4-6,2 Kb se realizó en geles a una concentración de 0,4% de agarosa a 1 V/cm durante 27-35 horas a temperatura ambiente. En cambio, para fragmentos menores de 4 Kb las condiciones de primera dimensión fueron: 0,5% de agarosa, 1 V/cm, 27 horas. La segunda dimensión para el análisis de formas digeridas se realizó siempre a 4 °C y en presencia de 0,3 µg/ml de EthBr. Para fragmentos de DNA de un tamaño comprendido entre 4-6,2 Kb, las condiciones fueron 0,9-1% de agarosa, 5 V/cm, 8-12 horas. En el caso de fragmentos inferiores a 4 Kb se realizó en geles a una concentración de 1,2% de agarosa y se corrieron a 5 V/cm durante 11 horas a 4 °C.

3.10.2. Transferencia del DNA a soportes sólidos

Los geles de agarosa se transfirieron a membranas de nailon (*Zeta-Probe® GT Blotting Membranes*, Bio-Rad y *Nylon Membranes, positively charged*, Roche) según el método de *Southern* (Southern, 1975) y de acuerdo al protocolo de transferencia alcalina descrito por López-Estraño y colaboradores (Lopez-Estraño et al., 1998).

3.10.3. Marcaje de sondas no radiactivas

Las sondas de DNA (300 ng de DNA) se marcaron con digoxigenina mediante el kit de marcaje no radiactivo *DIG-High-Prime* (Roche) siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

3.10.4. Hibridación de ácidos nucleicos con sondas no radiactivas

Las membranas de nailon se incubaron en botellas cilíndricas, durante 4-6 horas a 65 °C, en 20 ml de una solución de SSPE 2x (NaCl 360 mM, Na₂HPO₄·7H₂O 20 mM y EDTA 2 mM pH 8,0), leche descremada al 0,5%, sulfato de dextrano (Sigma) al 10%, SDS al 1% y DNA de esperma de salmón (AppliChem) 0,5 mg/ml, sonificado y desnaturalizado. Para la hibridación, la sonda desnaturalizada se añadió a una concentración de 20 ng/ml y se incubaron en botellas durante 16 horas a 65 °C. Transcurrido ese tiempo las membranas se lavaron, secuencialmente, dos veces con SSC 2x/SDS 0,1% durante 5 minutos cada lavado y dos veces con SSC 0,1x/SDS 0,1%, precalentado a 68 °C, durante 15 minutos cada lavado. Finalmente, la detección se realizó con un anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina (*Anti-Digoxigenin-AP*, Roche) y un sustrato quimioluminiscente (*CDP-Star*®, PerkinElmer) según el protocolo descrito por la casa comercial.

3.10.5. Densitometría

Los análisis densitométricos de las inmunodetecciones se realizaron con el programa *ImageJ 64* (NIH).

3.10.6. Secuenciación

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo utilizando un secuenciador automático modelo *Abi Prism 3700*® (Applied Biosystems) por Secugen en el CIB-CSIC.

3.11. Extracción y purificación de RNA

Para aislar y purificar RNA total se utilizó el kit de extracción *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen). Se siguió el protocolo administrado por la casa comercial partiendo de 5×10^8 células. Además se realizó un tratamiento con DNAsa (*RNase Free DNase Set*, Qiagen) para evitar la contaminación con DNA.

3.12. RT-qPCR

Para la realización de las RT-qPCRs (retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa) se sintetizó cDNA de cadena sencilla a partir de 2 µg de RNA total de células top2-td de *S. cerevisiae* transformadas con los cromosomas pYAC y YAC así como de células top2-td sin transformar (control negativo). Se utilizaron 250 ng de *random primers* (Invitrogen) y 200 unidades de *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen). La reacción se llevó a cabo a 25 °C durante 10 minutos, 42 °C durante 50 minutos y, finalmente, se inactivó la enzima a 70 °C durante 15 minutos.

La amplificación de cDNA se realizó en el equipo *iQ5 System* (Bio-Rad) en el servicio de Proteómica del CIB-CSIC. La mezcla de la reacción consistió en 1x *SYBR® Green Supermix* (Bio-Rad), 1 µl de cDNA y 0,2 µM de cada oligonucleótido. Los oligonucleótidos utilizados se detallan en la Tabla 2 y fueron sintetizados por Sigma. Las condiciones de la PCR a tiempo real fueron: 95 °C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 30 segundos y 60 °C durante 30 segundos.

Tabla 2. Parejas de oligonucleótidos utilizados para la realización de las PCRs cuantitativas de expresión génica.

Nombre	Secuencia (5'-3')
<i>ACT</i> Fwd	TTATTGATAACGGTTCTGGTATG
<i>ACT</i> Rv	CCTTGGTGTCTTGGTCTAC
<i>URA3</i> Fwd	TAAAGGCATTATCCGCCAAG
<i>URA3</i> Rv	CCCGCAGAGTACTGCAATTT

3.12.1. Análisis de la expresión relativa mediante el modelo de Pfaffl

El análisis de la expresión relativa de los genes analizados por RT-qPCR se llevó a cabo por el servicio de Bioinformática del CIB-CSIC. Dicho análisis se basó en los valores umbrales de ciclo o Cts (del inglés *threshold cycle*) obtenidas en la PCR a tiempo real y en el modelo matemático desarrollado por Pfaffl (Pfaffl, 2001). En dicho modelo, el nivel de transcripción que presenta el gen en estudio es normalizado con relación a un gen de referencia y las diferentes eficiencias de la PCR tanto para el gen en estudio como para el gen de referencia se tienen en cuenta como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{Proporción} = E_{URA3}^{\Delta Ct \text{ URA3 (circular - lineal)}} / E_{ACT}^{\Delta Ct \text{ ACT (circular - lineal)}} \quad (4)$$

En esta ecuación la proporción del gen de estudio (Uracilo –*URA3*–) se expresa en una muestra (en pYAC, en plásmido circular) frente a un control (en YAC, topología lineal) y en comparación con un gen de referencia (Actina –*ACT*–). *E* representa la eficiencia de la PCR en tiempo real de los oligonucleótidos usados para cada gen. ΔCt es la desviación en Ct del control menos la muestra, del gen de estudio o del gen de referencia.

El análisis de los datos se realizó con el *software iQ5 2.0 Standard Edition Optical System* y *Microsoft Excel 2010*. Para calcular las eficiencias intrínsecas de cada trío de réplicas se utilizaron los valores crudos de las fluorescencias de cada reacción y el programa DART (*Data Analysis for Real-Time PCR*) desarrollado por Peirson y colaboradores (Peirson et al., 2003). Una vez halladas las eficiencias, las diferencias relativas de los genes en estudio y su análisis estadístico se realizó con el programa REST® (*Relative Expression Software Tool*) desarrollado por Pfaffl y colaboradores (Pfaffl et al., 2002).

4. RESULTADOS

4.1. Estudio de la movilidad electroforética de moléculas superenrolladas, encadenadas y anudadas

Como se comentó en la Introducción, la electroforesis bidimensional en geles de agarosa es el método de elección para separar topoisómeros de moléculas circulares de DNA (Fernandez et al., 2014; Schvartzman et al., 2013b). Para optimizar la separación de topoisómeros que difieren en su grado de anudamiento, encadenamiento o superenrollamiento, decidimos variar sistemáticamente las condiciones de la electroforesis. Con este objetivo, comparamos el comportamiento electroforético de tres familias diferentes de topoisómeros de DNA: 1) Moléculas de DNA superenrolladas, donde el nivel de superenrollamiento cubre el rango desde moléculas covalentemente cerradas relajadas hasta moléculas con el superenrollamiento nativo de las mismas, 2) Moléculas encadenadas con un número de encadenamientos desde 1 hasta 15, aproximadamente, 3) Moléculas de DNA anudadas y con roturas de cadena sencilla. Se utilizó el plásmido pBR18 y estudiamos familias de topoisómeros con la misma masa molecular. Para moléculas superenrolladas y anudadas analizamos las formas diméricas del plásmido (8766 pb) mientras que los encadenados estaban compuestos de dos formas monoméricas del mismo plásmido (2 x 4383 pb).

4.1.1. Análisis de la movilidad electroforética de moléculas superenrolladas, encadenadas y anudadas en condiciones estándar

Empleamos la electroforesis bidimensional en geles de agarosa para analizar, de manera independiente, diferentes poblaciones de topoisómeros. En este caso, las condiciones de la electroforesis fueron de 0,4% de agarosa y 1,0 V/cm en primera dimensión y 1,0% de agarosa y 5,0 V/cm en segunda.

Con el fin de obtener las tres familias de topoisómeros requeridas para el estudio, se añadió norfloxacin a los cultivos celulares (véase el apartado 3.1 de Materiales y Métodos) para inhibir la DNA girasa y la Topo IV *in vivo* (Khodursky et al., 1995; Martinez-Robles et al., 2009; Zechiedrich and Cozzarelli, 1995). Las células mutantes de *E. coli* resistentes a este antibiótico permiten la inhibición selectiva de la DNA girasa o la Topo IV.

En primer lugar, los topoisómeros superenrollados se obtuvieron con el plásmido pBR18 transformando células de la estirpe LZ38 de *E. coli* (Zechiedrich et al., 2000; Zechiedrich et al., 1997). Las células de esta estirpe son *recA*+. La proteína RecA está implicada en recombinación homóloga (Chen et al., 2008) y, por tanto, en la estirpe LZ38 además de las formas monoméricas se observan formas multiméricas del plásmido. Estas células portan también una mutación en el gen *parC* (*parC*^{K84}) que hace que la Topo IV sea resistente a la norfloxacin. Este fármaco inhibe las topoisomerasas de tipo II (Drlica, 1999) pero como en las células LZ38 la Topo IV es resistente a la norfloxacin, sólo la DNA girasa se ve afectada. Así, tratando las células con norfloxacin (150 µM) obtuvimos plásmidos pobremente superenrollados, con un bajo nivel de superenrollamiento. En la Figura 16A se muestran dos dibujos esquemáticos de las moléculas superenrolladas analizadas por electroforesis bidimensional. A la izquierda de la Figura 16B se muestra la inmunodetección correspondiente a la electroforesis bidimensional del plásmido pBR18 aislado de la estirpe LZ38 con el tratamiento de norfloxacin mencionado y, a la derecha un esquema interpretativo. El arco que aparece en la parte inferior derecha corresponde a las formas superenrolladas de los monómeros que no estaban replicando en el momento en el que se detuvo el cultivo, los Scms. Las distintas señales que generan el arco, son topoisómeros con distinto grado de superenrollamiento, desde moléculas con el superenrollamiento nativo de las mismas hasta moléculas que se han relajado (OCms) por el tratamiento con norfloxacin o por roturas de cadena sencilla durante la extracción. Partiendo de la señal de OCms se aprecia un segundo arco correspondiente a moléculas diméricas superenrolladas (Scds) que presenta menor movilidad electroforética que el arco de Scms tanto en primera como en segunda dimensión. En el esquema ilustrativo los Scms se representan en negro mientras que los Scds se muestran en azul.

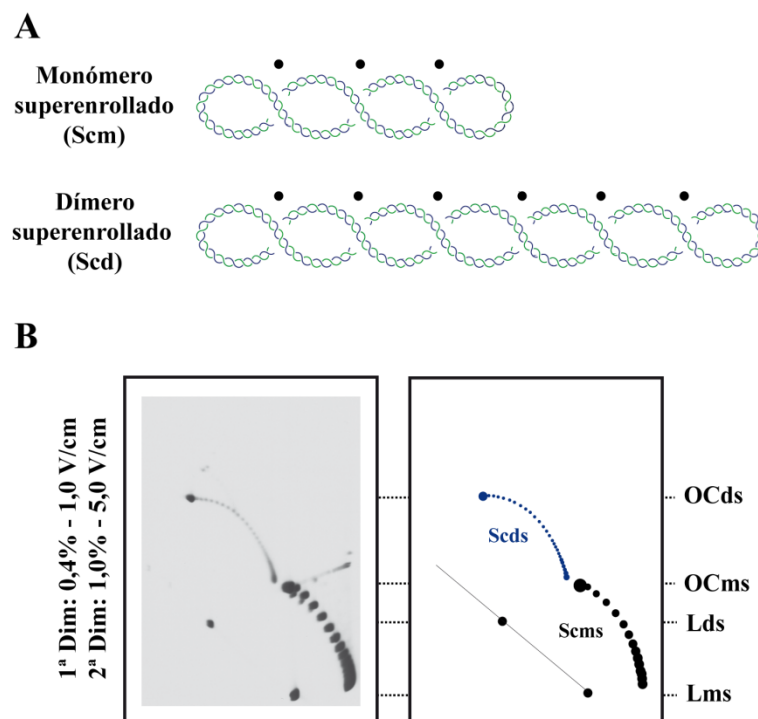


Figura 16. Esquemas e inmunodetección de las moléculas superenrolladas analizadas por electroforesis bidimensional en geles de agarosa. A: Esquema de un monómero (Scm) y dímero superenrollado (Scd) representados con una densidad de cruces similar. Los cruces intramoleculares se señalan con un punto negro. **B:** Inmunodetección correspondiente al gel bidimensional de las formas superenrolladas del plásmido pBR18 aislados de células LZ38 de *E. coli* tratadas con 150 μ M de norfloxacin en la fase exponencial del cultivo. A la derecha de la inmunodetección se muestra un esquema interpretativo en donde los Scms se representan en negro y las señales los Scds se representan en azul.

Para lograr preparaciones de DNA enriquecidas en encadenados del tipo CatAs, se transformaron células de *E. coli* de la estirpe DH5 α F' con el plásmido pBR18. Estas células de *E. coli* son *recA*- y, por esta razón, se forman relativamente pocos multímeros. Además, estas células portan una mutación en el gen *gyrA* (*gyrA96*) confiriendo a la DNA girasa resistencia frente a la norfloxacin. En estas células la norfloxacin sólo inhibe la Topo IV, permitiendo la acumulación de moléculas encadenadas (Adams et al., 1992). Por ello, se añadió norfloxacin (15 μ M) al cultivo y una vez que se aisló este material, se trató con la enzima de restricción de cadena sencilla *Nb.BsmI* para convertir todos los tipos de encadenados en CatAs. El tratamiento con dicha enzima provoca que todos los CCCms pierdan el superenrollamiento y pasen a ser OCms. Además, al perder el superenrollamiento, quedan expuestas las moléculas que se encontraban anudadas (Knms) antes de la actuación de la enzima. Como se comentó en la Introducción, el superenrollamiento enmascara el anudamiento de las moléculas por lo que sólo son

visibles en una electroforesis cuando han perdido el superenrollamiento. En la Figura 17A se representan, con dos dibujos esquemáticos, las moléculas analizadas por electroforesis bidimensional en geles de agarosa (Knms y CatAs). En la Figura 17B se muestra, a la izquierda, la inmunodetección correspondiente al gel bidimensional de las formas anudadas y encadenadas del plásmido pBR18 aislado de células DH5αF' de *E. coli* tratadas con 15 μM de norfloxacin en la fase exponencial del cultivo y tratadas con *Nb.BsmI*. A la derecha, el esquema interpretativo. No se aprecian CCCms indicando que la digestión fue total, de manera que esas moléculas perdieron todo el superenrollamiento y pasaron a migrar como OCms. A la derecha de los OCms se extiende un arco discontinuo que corresponde a los monómeros anudados (representadas en color naranja). Además, se observa la presencia de moléculas encadenadas del tipo CatA (arco de color verde claro).

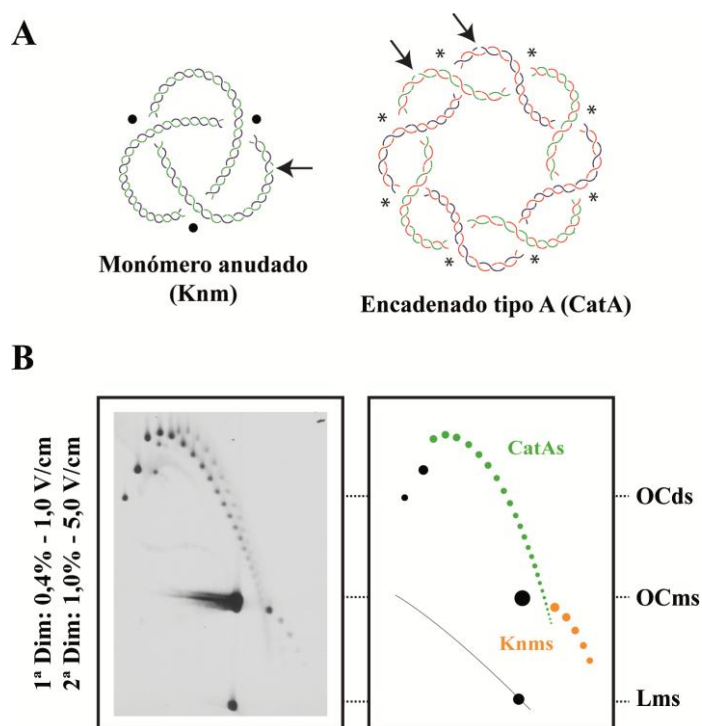


Figura 17. Esquemas e inmunodetección de las moléculas anudadas y encadenadas analizadas por electroforesis bidimensional en geles de agarosa. **A:** Esquema de un monómero anudado (Knms) y dos monómeros encadenados tipo A (CatAs). La doble hélice parental se representa con los colores azul y verde mientras que las cadenas de nueva síntesis se representan en rojo. Los cruces intramoleculares se señalan con un punto negro y los cruces intermoleculares con un asterisco. Las flechas señalan la rotura de cadena sencilla **B:** Inmunodetección correspondiente al gel bidimensional de las formas anudadas y encadenadas del plásmido pBR18 aislado de células DH5αF' de *E. coli* tratadas con 15 μM de norfloxacin en la fase exponencial del cultivo y tratadas con *Nb.BsmI*. A la derecha de la inmunodetección se muestra un esquema interpretativo con las señales de los Knms en color naranja y las señales de los CatAs en verde claro.

Para conseguir dímeros anudados (Knds) se transformaron células de la estirpe parE10 (*recA*-) de *E. coli* con dímeros de pBR18. En este caso, se expusieron las células a norfloxacin (15 μ M) para relajar parcialmente las moléculas no replicadas superenrolladas. A diferencia de lo que ocurre en monómeros, los Knds no comigran con los Scds en la segunda dimensión. Por ello, ambos tipos de dímeros pueden ser visualizados en la misma inmunodetección del gel. En la Figura 18A se muestra un dibujo esquemático de la molécula analizada por electroforesis bidimensional en geles de agarosa. En la Figura 18B se ilustra, a la izquierda, la inmunodetección correspondiente al gel bidimensional de las formas superenrolladas y anudadas del plásmido pBR18 aislado de células parE10 de *E. coli* tratadas con 15 μ M de norfloxacin en la fase exponencial del cultivo. A la derecha, un esquema interpretativo. Se puede ver el arco correspondiente a la población de dímeros con distinto grado de superenrollamiento (Scds) y el arco, en la parte superior del gel, correspondiente a Knds. En el esquema ilustrativo, a la derecha, los Scds se señalan en azul y los Knds en magenta.

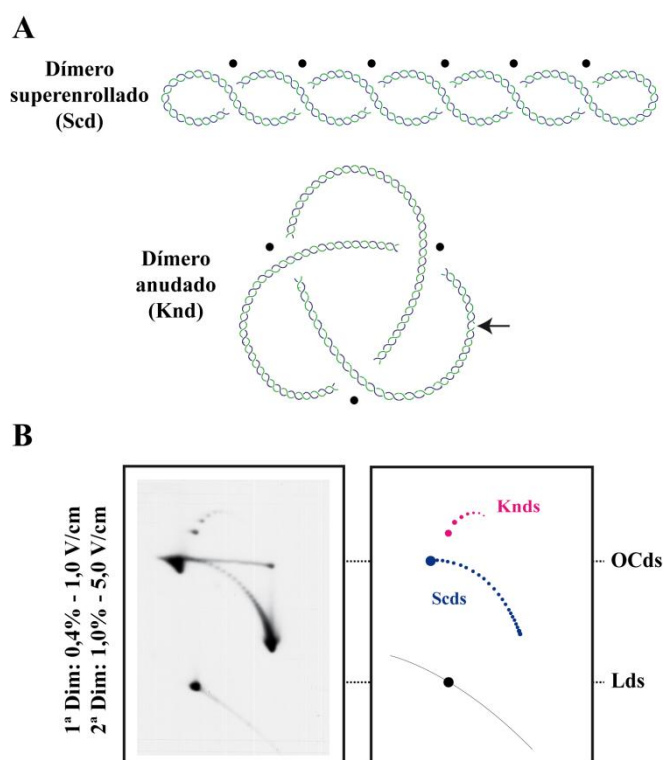


Figura 18. Esquemas e inmunodetección de las moléculas superenrolladas y anudadas analizadas por electroforesis bidimensional en geles de agarosa. A: Esquema de un dímero superenrollado (Scd) y un dímero anudado (Knd). Los cruces intramoleculares se señalan con un punto negro. La flecha señala la rotura de cadena sencilla. **B:** Inmunodetección correspondiente al gel bidimensional de las formas superenrolladas y anudadas del plásmido pBR18 aislado de células parE10 de *E. coli* tratadas con 15 μ M de norfloxacin en la fase exponencial del cultivo. A la derecha de la inmunodetección se muestra un esquema interpretativo con las señales de los Scd en azul y las señales de los Knds en magenta.

Una vez obtenidas las tres familias de topoisómeros y analizadas por electroforesis bidimensional de manera independiente, quisimos estudiar cómo les afectan determinados cambios en las condiciones de la segunda dimensión (concentración de agarosa y voltaje). En primer lugar, se usaron las mezclas apropiadas de los DNAs aislados de los diferentes tipos celulares para analizar, por un lado la movilidad electroforética de los Scds y CatAs (Figura 16 y 17, respectivamente) y, por otro lado, la de los Scds y los Knds (Figura 16 y 18, respectivamente). Los Scds fueron, por tanto, analizados en dos experimentos diferentes. En la Figura 19A y 19B se ilustran las inmunodetecciones correspondientes a los dos experimentos con las mencionadas mezclas de las poblaciones en condiciones estándar en segunda dimensión (concentración de agarosa 1,0% y voltaje 5,0 V/cm). En la Figura 19A se muestra la inmunodetección correspondiente a la mezcla de Scds y CatAs y en la Figura 19B la mezcla de Scds y Knds. A la derecha de cada inmunodetección se representa un esquema interpretativo. La movilidad electroforética de las moléculas de Scds fue similar en ambos experimentos. En la Figura 19C se representa el gráfico comparativo de la movilidad electroforética de los Scds mostrados en los apartados A y B de la misma figura. La comparación de las dos inmunodetecciones evidenció que la diferencia entre los experimentos no es significativa. La movilidad electroforética de los diferentes topoisómeros se expresa en función de su complejidad topológica (ΔC) en el eje de abscisas y de la distancia recorrida en mm/h en el eje de ordenadas. ΔC es una medida práctica que indica cuántos espacios hay entre las señales de DNA en un arco dado (de moléculas superenrolladas, encadenadas o anudadas). Es decir, indica la separación de una señal concreta de la señal formada por la molécula del mismo tamaño en estado relajado. Para las familias de moléculas superenrolladas y anudadas, la molécula que en ambas familias tiene la menor complejidad es la OC ($\Delta C = 0$). En cambio, la señal que representa una menor complejidad en la familia de CatAs es aquella que presenta un único encadenamiento ($C_a=1$) y en este caso, su ΔC es 1.

En base a estos resultados y puesto que prácticamente no había diferencia para los análisis comparativos posteriores, se decidió utilizar los datos obtenidos de los apartados B de las figuras señaladas en cada caso. Las tablas con los datos obtenidos de las diferentes inmunodetecciones del estudio sobre la movilidad electroforética de las tres poblaciones (superenrolladas, encadenadas y anudadas) se añaden en la sección de Material Suplementario al final de la Tesis.

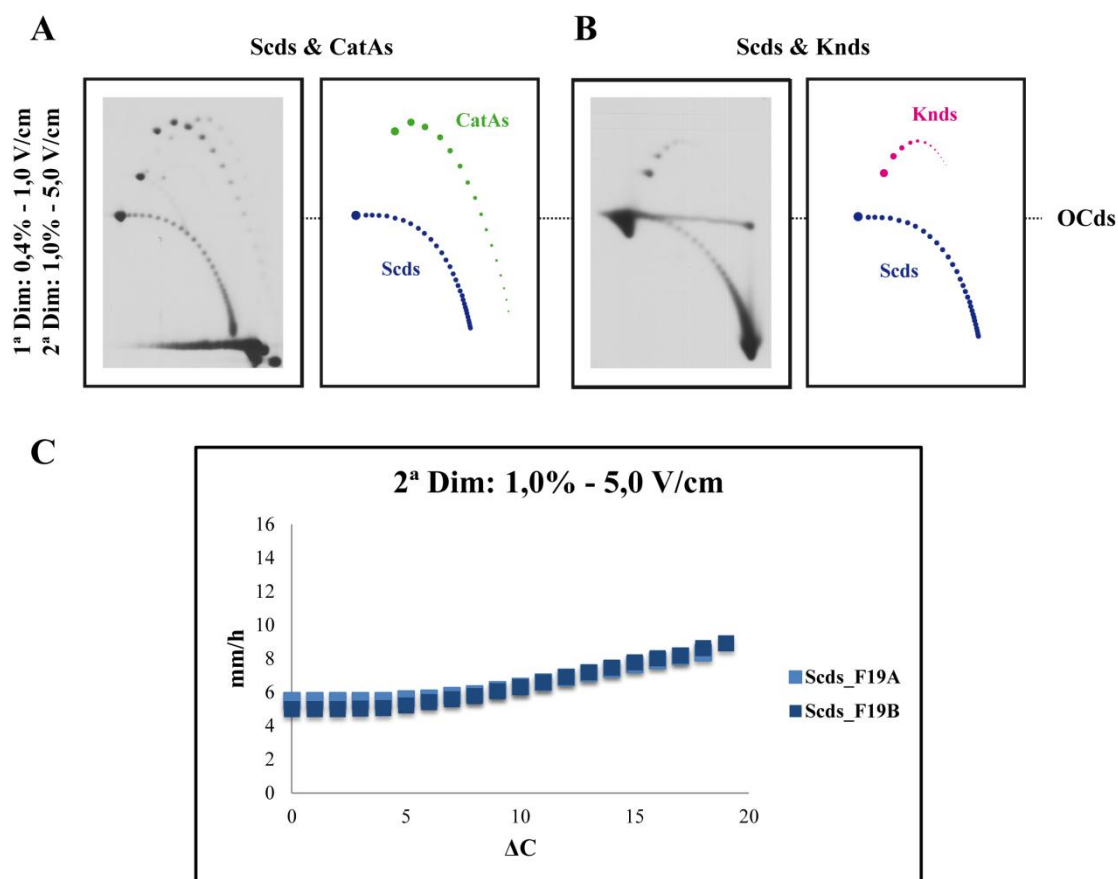


Figura 19. Comparación de la movilidad electroforética de los dímeros superenrollados durante la segunda dimensión en condiciones estándar. **A:** Inmunodetección correspondiente al gel bidimensional con la mezcla de DNAs de dímeros superenrollados (Scds) y monómeros encadenados (CatAs). **B:** Inmunodetección correspondiente al gel bidimensional con la mezcla de DNAs de Scds y monómeros anudados (Knds). **C:** Gráfica comparativa de la movilidad electroforética de los Scds durante la segunda dimensión de los gels bidimensionales mostrados en la Figura 19A (azul claro) y B (azul oscuro). La movilidad electroforética de los diferentes topoisómeros se expresa en función de su complejidad topológica (ΔC) en el eje de abscisas y de la distancia recorrida en mm/h en el eje de ordenadas.

4.1.2. Análisis de la movilidad electroforética de moléculas superenrolladas, encadenadas y anudadas a diferentes voltajes en la segunda dimensión

Para analizar el papel del voltaje durante la segunda dimensión en las tres familias de topoisómeros, decidimos utilizar la electroforesis bidimensional en la que la segunda dimensión tenía lugar a 5,0, 5,8 y 6,6 V/cm en gels siempre de 1,0% de agarosa. En la Figura 20 se muestran las diferentes inmunodetecciones obtenidas con sus respectivos diagramas interpretativos donde los CatAs se representan en verde claro, los Scds en azul y los Knds en magenta. Con las inmunodetecciones hallamos la movilidad electroforética

de los diferentes topoisómeros. A partir de estos datos, se realizaron las gráficas comparativas (Figura 21) de la movilidad electroforética de las diferentes familias de topoisómeros durante la primera y segunda dimensión donde la segunda dimensión ocurrió a diferentes voltajes. En las gráficas, la movilidad electroforética se expresa en función de ΔC en el eje de abscisas y de la distancia recorrida en mm/h en el eje de ordenadas.

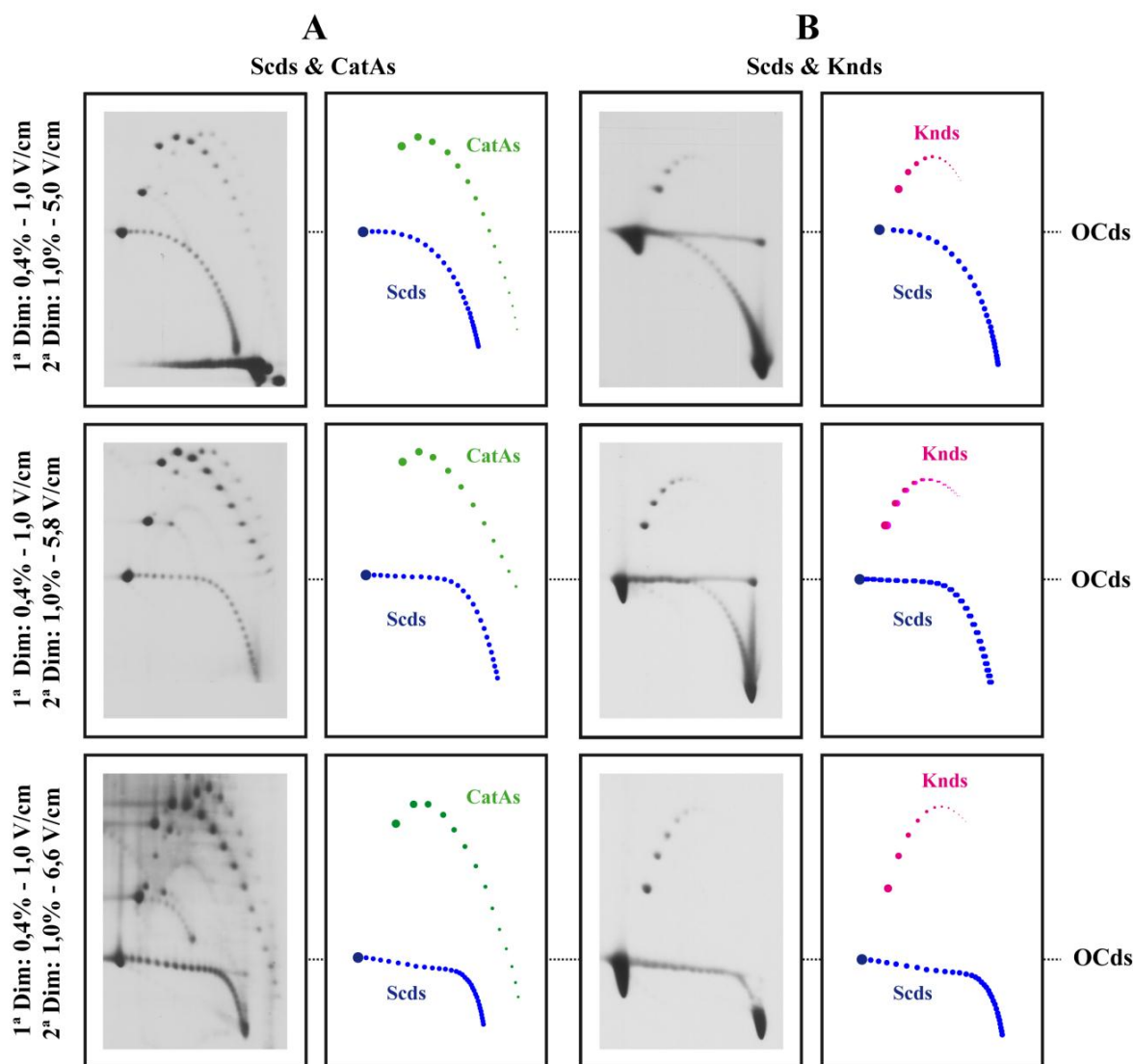


Figura 20. Inmunodetecciones de mezclas de muestras de DNAs analizadas por electroforesis bidimensional donde la segunda dimensión se realizó en geles de 1,0% de agarosa a diferentes voltajes. A: Mezcla de dímeros superenrollados (Scds) y dímeros anudados (KnDs) B: Mezcla de Scds y monómeros encadenados (CatAs). A la izquierda se muestran las condiciones de la electroforesis. A la derecha de cada inmunodetección se coloca un diagrama interpretativo. Los Scds se representan en azul, los CatAs en verde claro y los KnDs en magenta.

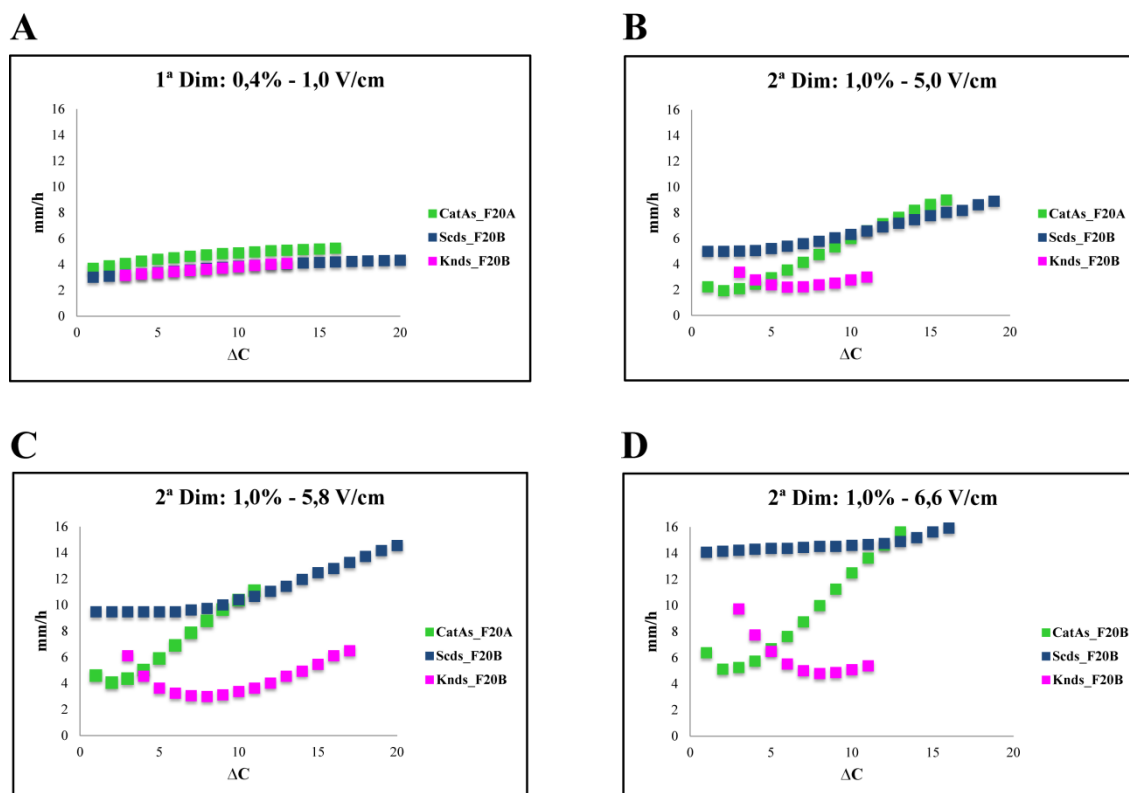


Figura 21. Comparación de la movilidad electroforética de los diferentes topoisómeros durante la primera y segunda dimensión donde la segunda dimensión ocurrió a diferentes voltajes. **A:** Gráfica comparativa de las tres familias de topoisómeros durante la primera dimensión en geles de 0,4% de agarosa y 1,0 V/cm. **B:** Gráfica comparativa de las tres familias de topoisómeros durante la segunda dimensión en geles de 1,0% de agarosa y 5,0 V/cm. **C:** Gráfica comparativa de las tres familias de topoisómeros durante la segunda dimensión en geles de 1,0% de agarosa y 5,8 V/cm. **D:** Gráfica comparativa de las tres familias de topoisómeros durante la segunda dimensión en geles de 1,0% de agarosa y 6,6 V/cm. La movilidad electroforética de los diferentes topoisómeros se expresa en función de su complejidad topológica (ΔC) en el eje de abscisas y de la distancia recorrida en mm/h en el eje de ordenadas. En la leyenda se indican las figuras analizadas para la obtención de los datos. Los encadenados (CatAs) se representan en verde claro, los dímeros superenrollados (Scds) en azul y los dímeros anudados (KnDs) en magenta.

La movilidad electroforética durante la primera dimensión (0,4% de agarosa, 1,0 V/cm) de los diferentes topoisómeros de la misma masa y $\Delta C = 1$ durante la primera dimensión varió entre 3,02 mm/h para Scds y 3,70 mm/h para CatAs. Para KnDs hay que tener en cuenta que el nudo más simple es el llamado nudo en forma de hoja de trébol (del inglés *trefoil*) el cual tiene 3 cruces (Stasiak et al., 1996; Vologodskii et al., 1998). Por lo tanto, la primera especie molecular para los KnDs tiene $\Delta C = 3$ y presentó una movilidad de 3,16 mm/h. Los datos representados en la Figura 21A indican que la movilidad de los diferentes topoisómeros aumenta ligeramente conforme aumenta su ΔC , es decir, la movilidad de los diferentes topoisómeros se incrementa con su compactación general (Crisona et al., 1994; Laurie et al., 1998; Stasiak et al., 1996; Vologodskii et al., 1998).

Este incremento de la movilidad no se observa, sin embargo, durante la segunda dimensión (Figura 20 y Figura 21B, C y D). Durante la segunda dimensión en condiciones de 1,0% de agarosa y voltajes de 5,0, 5,8 y 6,6 V/cm, la movilidad electroforética fue, respectivamente, de 5,00, 9,49 y 14,09 mm/h para Scds (con $\Delta C=1$), 2,25, 4,59 y 6,38 mm/h para CatAs (con $\Delta C=1$) y 3,38, 6,11 y 9,74 para Knds (con $\Delta C=3$). En segunda dimensión, la movilidad electroforética de las tres poblaciones de topoisómeros conforme aumenta su ΔC fue significativamente diferente una de otra.

En la Figura 22 se representan las gráficas con los datos de movilidad relativa de los diferentes topoisómeros. Esta movilidad relativa hace referencia, dentro de cada familia, a la movilidad de los topoisómeros conforme aumenta su ΔC con respecto a la movilidad que presenta el miembro más sencillo de la familia (OC para las familias de moléculas superenrolladas y anudadas y CatA con $\Delta C=1$ para la familia de moléculas encadenadas). De esta forma, se manifiestan más claramente las diferencias entre las tres familias de topoisómeros. Durante la primera dimensión (Figura 22A), la movilidad relativa de las tres poblaciones aumentó conforme aumenta su ΔC de manera muy similar en los tres casos. Sin embargo, durante la segunda dimensión (Figura 22B, C y D), para moléculas con bajo ΔC , excepto para los Scds, la movilidad electroforética fue inversamente proporcional a su ΔC . Este comportamiento es evidente para Knds donde la movilidad electroforética permanece retardada hasta moléculas con un $\Delta C = 8$. Por otra parte, durante esta segunda dimensión, el comportamiento de los CatAs es también llamativo. Su movilidad electroforética se retarda para las primeras moléculas con $\Delta C = 2-4$ pero, a partir de entonces, ganan rápidamente movilidad con cada ΔC adicional. Para Scds, la movilidad electroforética de los topoisómeros con ΔC creciente permanece bastante constante hasta $\Delta C = 6, 8$ y 14 en los geles a 5,0, 5,8 y 6,6 V/cm, respectivamente.

En resumen, durante la segunda dimensión, conforme aumenta el voltaje a una concentración de agarosa constante (1,0%), los topoisómeros con incrementos de ΔC se comportan de manera diferente según la población a la que pertenecen. Para moléculas con bajo ΔC ($>2-4 <10-15$), los CatAs ganan movilidad electroforética rápidamente, los Scds ganan algo y los Knds la reducen.

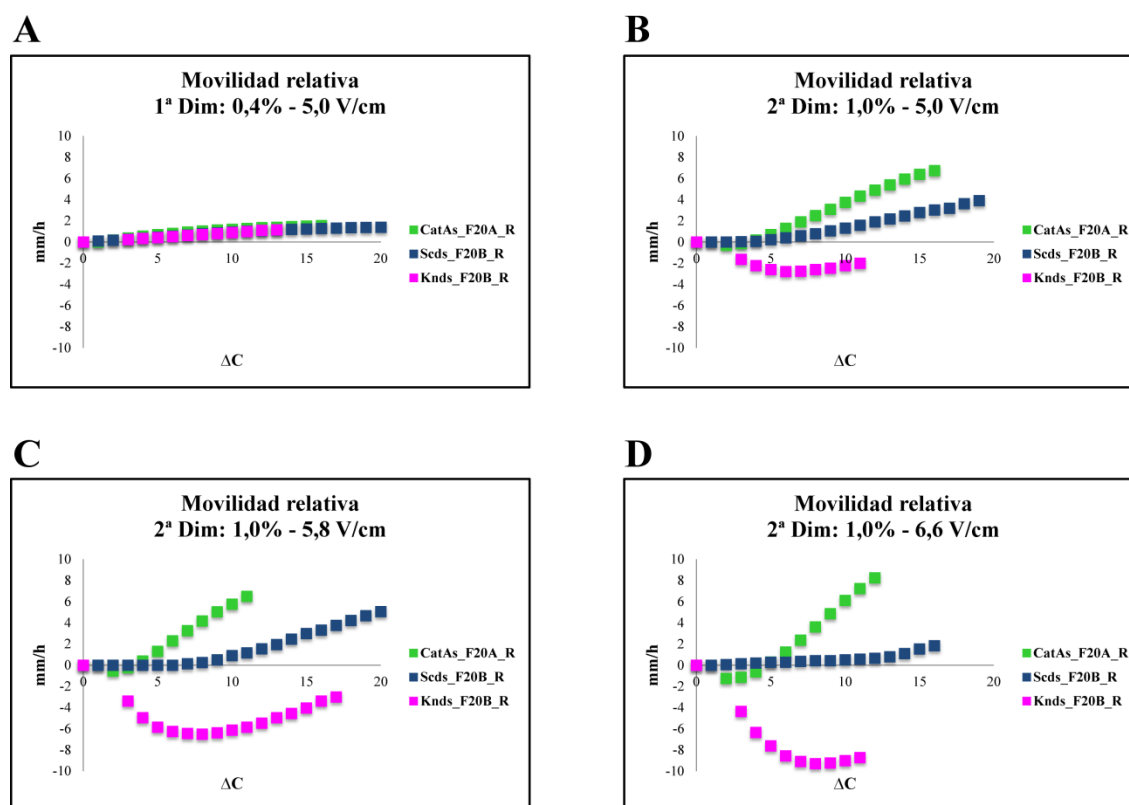


Figura 22. Comparación de la movilidad electroforética relativa de los diferentes topoisómeros durante la primera y segunda dimensión donde la segunda dimensión ocurrió a diferentes voltajes. **A:** Gráfica comparativa de las tres familias de topoisómeros durante la primera dimensión en geles de 0,4% de agarosa y 1,0 V/cm. **B:** Gráfica comparativa de las tres familias de topoisómeros durante la segunda dimensión en geles de 1,0% de agarosa y 5,0 V/cm. **C:** Gráfica comparativa de las tres familias de topoisómeros durante la segunda dimensión en geles de 1,0% de agarosa y 5,8 V/cm. **D:** Gráfica comparativa de las tres familias de topoisómeros durante la segunda dimensión en geles de 1,0% de agarosa y 6,6 V/cm. La movilidad electroforética relativa (referida a la movilidad de las moléculas con aumento de ΔC dentro de cada familia, expresada con respecto a la movilidad mostrada por el miembro más simple de la familia) se expresa en función de la complejidad topológica (ΔC) en el eje de abscisas y de la distancia recorrida en mm/h en el eje de ordenadas. En la leyenda se indican las figuras analizadas para la obtención de los datos. Los encadenados (CatAs) se representan en verde claro, los dímeros superenrollados (Scds) en azul y los dímeros anudados (Knds) en magenta.

4.1.3. Análisis de la movilidad electroforética de moléculas superenrolladas, encadenadas y anudadas a diferentes concentraciones de agarosa en la segunda dimensión

Para analizar el papel de la concentración de agarosa durante la segunda dimensión en las tres familias de topoisómeros, se utilizó la electroforesis bidimensional en la que la segunda dimensión tuvo lugar en geles al 0,8, 1,0 y 1,2% de agarosa siempre a un voltaje de 5,0 V/cm. En la Figura 23 se muestran las diferentes inmunodetecciones obtenidas con sus respectivos diagramas interpretativos donde los CatAs se representan en verde claro, los Scds en azul y los KnDs en magenta. Con las inmunodetecciones se calculó la movilidad electroforética de los diferentes topoisómeros. A partir de estos datos, se realizaron las gráficas comparativas (Figura 24) de la movilidad electroforética de las diferentes familias de topoisómeros durante la primera y segunda dimensión, donde la segunda dimensión ocurrió en geles a diferentes concentraciones de agarosa. En las gráficas, la movilidad electroforética se expresa en función de ΔC en el eje de abscisas y de la distancia recorrida en mm/h en el eje de ordenadas.

Como se puede observar en la Figura 23 y en las gráficas de la Figura 24, el efecto de la concentración de agarosa a un voltaje constante (5,0 V/cm) durante la segunda dimensión es significativamente diferente para cada familia. Comparando los geles con una concentración de 0,8 y 1,2% de agarosa, la movilidad electroforética de CatAs y Scds con $\Delta C = 1$, decrece de 5,60 y 9,25 mm/h a 0,64 y 2,59 mm/h, respectivamente. En el caso de un nudo *trefoil* de dímeros ($\Delta C = 3$), su movilidad electroforética decrece de 7,40 mm/h a 1,45 mm/h.

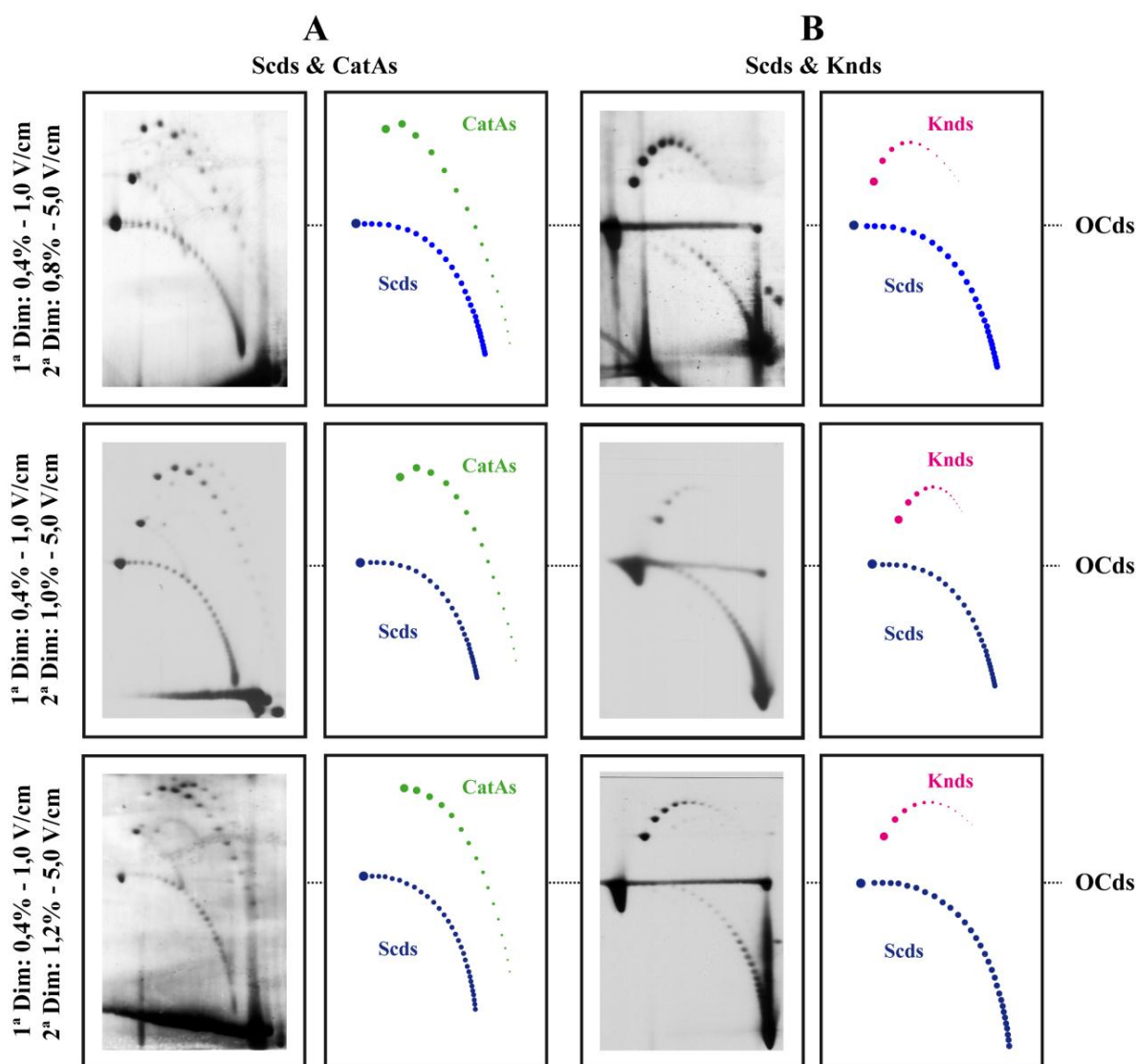


Figura 23. Inmunodetecciones de mezclas de muestras de DNAs analizadas por electroforesis bidimensional donde la segunda dimensión se realizó a un voltaje de 5,0 V/cm en diferentes concentraciones de agarosa. A: Mezcla de dímeros superenrollados (Scds) y dímeros anudados (Knds) **B:** mezcla de Scds y monómeros encadenados (CatAs). A la izquierda se muestran las condiciones de la electroforesis. A la derecha de cada inmunodetección se coloca un diagrama interpretativo. Los Scds se representan en azul, los CatAs en verde claro y los Knds en magenta.

En la Figura 25 se representan las gráficas con los datos de movilidad relativa de los diferentes topoisómeros. Al igual que en las electroforesis de la Figura 20, durante la primera dimensión la movilidad relativa de las tres poblaciones aumenta conforme aumenta su ΔC de manera muy similar en los tres casos. Sin embargo, durante la segunda dimensión, para las tres familias de topoisómeros, se observa que conforme aumenta la concentración de agarosa los patrones de las tres familias adquieren formas similares, teniendo menor movilidad electroforética en los tres casos.

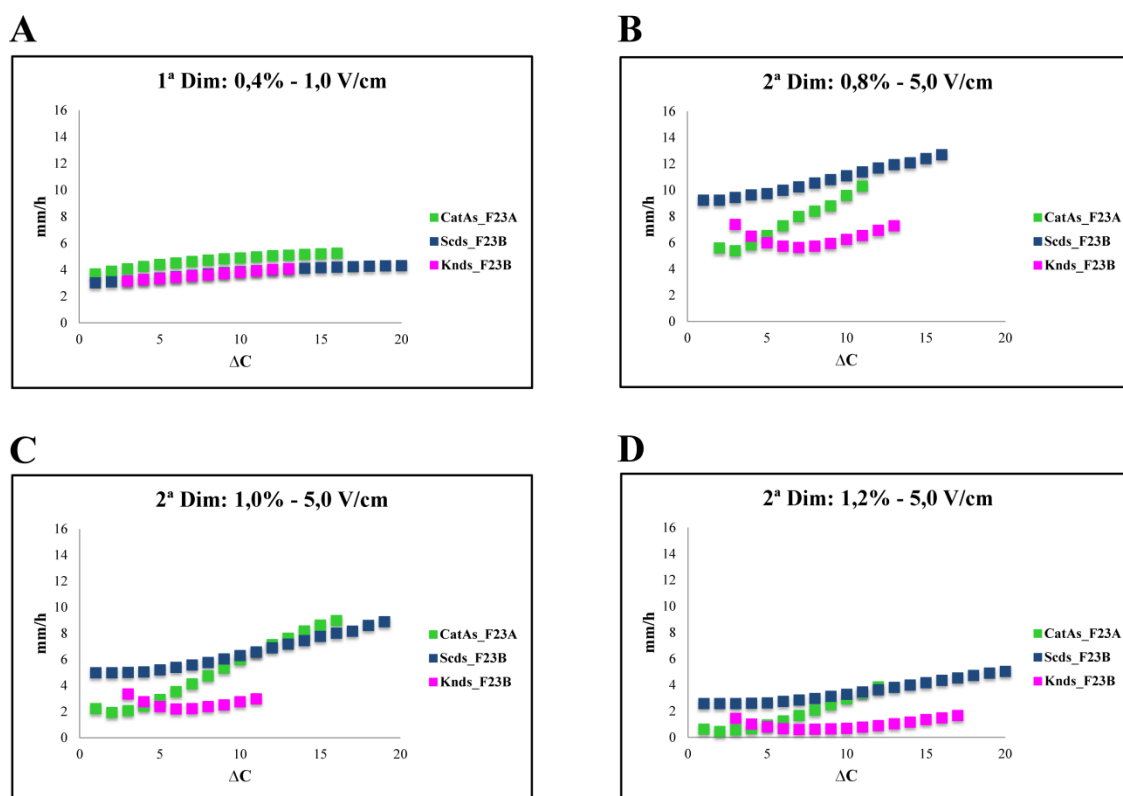


Figura 24. Comparación de la movilidad electroforética de los diferentes topoisómeros durante la primera y segunda dimensión donde la segunda dimensión ocurrió en diferentes concentraciones de agarosa. **A:** Gráfica comparativa de las tres familias de topoisómeros durante la primera dimensión en geles de 0,4% de agarosa y 1,0 V/cm. **B:** Gráfica comparativa de las tres familias de topoisómeros durante la segunda dimensión en geles de 0,8% de agarosa y 5,0 V/cm. **C:** Gráfica comparativa de las tres familias de topoisómeros durante la segunda dimensión en geles de 1,0% de agarosa y 5,0 V/cm. **D:** Gráfica comparativa de las tres familias de topoisómeros durante la segunda dimensión en geles de 1,2% de agarosa y 5,0 V/cm. La movilidad electroforética de los diferentes topoisómeros se expresa en función de su complejidad topológica (ΔC) en el eje de abscisas y de la distancia recorrida en mm/h en el eje de ordenadas. En la leyenda se indican las figuras analizadas para la obtención de los datos. Los encadenados (CatAs) se representan en verde claro, los dímeros superenrollados (Seds) en azul y los dímeros anudados (Knds) en magenta.

Los resultados obtenidos variando el voltaje o la concentración de agarosa durante la segunda dimensión indican que la contribución de un aumento de ΔC a la movilidad electroforética difiere para los Seds, CatAs y Knds dependiendo de las condiciones de electroforesis aplicadas. Con los resultados presentados, proponemos que para moléculas circulares de ≈ 8000 pb la mejor manera de distinguir las tres familias de topoisómeros es correr la primera dimensión en un gel al 0,4% de agarosa a 1,0 V/cm y la segunda dimensión en un gel al 1,0% de agarosa a 6,6 V/cm.

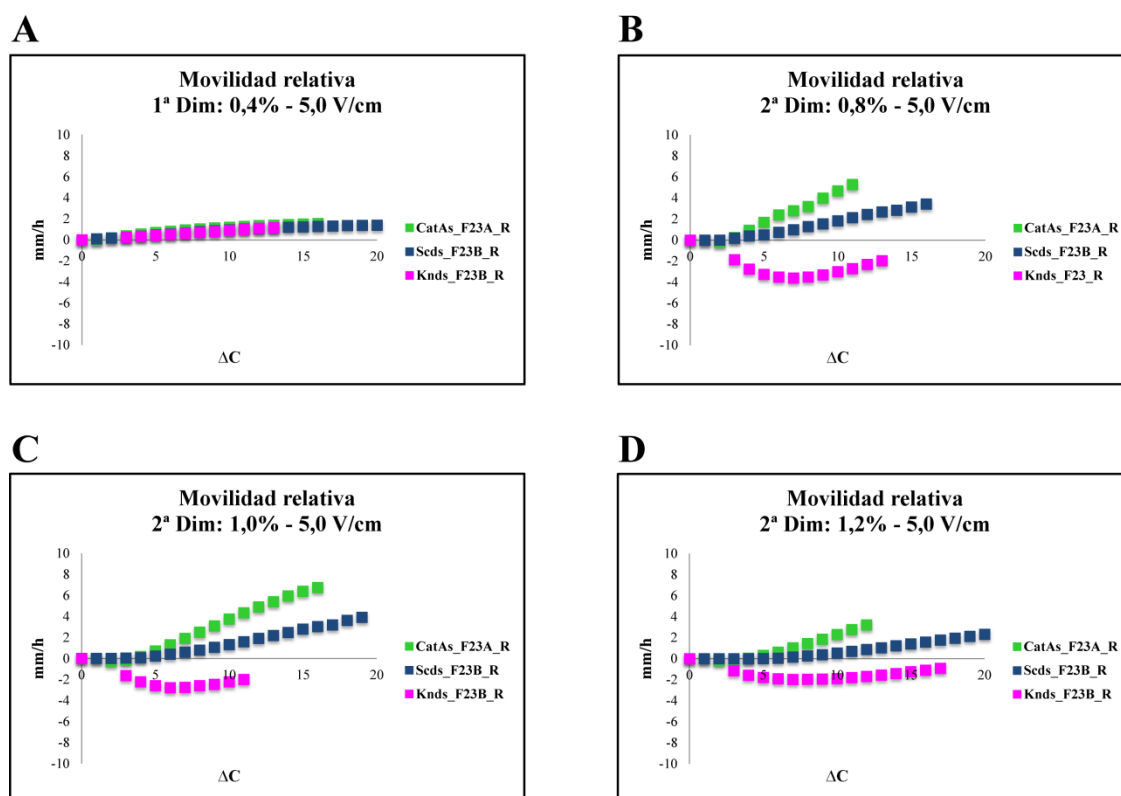


Figura 25. Comparación de la movilidad electroforética relativa de los diferentes topoisómeros durante la primera y segunda dimensión donde la segunda dimensión ocurrió en diferentes concentraciones de agarosa. A: Gráfica comparativa de las tres familias de topoisómeros durante la primera dimensión en geles de 0,4% de agarosa y 1,0 V/cm. **B:** Gráfica comparativa de las tres familias de topoisómeros durante la segunda dimensión en geles de 0,8% de agarosa y 5,0 V/cm. **C:** Gráfica comparativa de las tres familias de topoisómeros durante la segunda dimensión en geles de 1,0% de agarosa y 5,0 V/cm. **D:** Gráfica comparativa de las tres familias de topoisómeros durante la segunda dimensión en geles de 1,2% de agarosa y 5,0 V/cm. La movilidad electroforética relativa (referida a la movilidad de las moléculas con aumento de ΔC dentro de cada familia, expresada con respecto a la movilidad mostrada por el miembro más simple de la familia) se expresa en función de la complejidad topológica (ΔC) en el eje de abscisas y de la distancia recorrida en mm/h en el eje de ordenadas. En la leyenda se indican las figuras analizadas para la obtención de los datos. Los encadenados (CatAs) se representan en verde claro, los dímeros superenrollados (Seds) en azul y los dímeros anudados (Knds) en magenta.

4.2. Estudio de la dinámica de los cambios topológicos durante la replicación de plásmidos bacterianos

Para comprobar si las horquillas de replicación pueden girar libremente *in vivo* durante la replicación, se analizó, por electroforesis bidimensional, la topología de tres plásmidos derivados de pBR322 con la secuencia terminadora de la replicación *TerE* situada a diferentes distancias del origen *ColE1* (véase el apartado 3.4 de Materiales y Métodos). El bloqueo del progreso de la horquilla en estos plásmidos, denominados pBR-TerE@*StyI*, pBR-TerE@*AatII* y pBR-TerE@*DraI*, conduce a la acumulación de una masa 1,26, 1,60 y 1,80 veces la masa de las moléculas no replicadas, respectivamente. Estos plásmidos se aislaron de dos estirpes de *E. coli* que se diferencian en presentar la Topo IV activa o inactiva *in vivo*. El efecto de esta enzima sobre la torsión de los RIs plasmídicos, nos permitirá discutir sobre la dinámica de la topología durante la replicación. Las estirpes de *E. coli* utilizadas fueron DH5 α F' y parE10. La estirpe parE10 se caracteriza por tener una mutación termosensible para la Topo IV, además de ser *recA*- (Kato et al., 1990; Zechiedrich et al., 1997). La estirpe W3110, isogénica de parE10, fue descartada por ser una estirpe *recA*+ (Kato et al., 1990) y los multímeros generados complicarían la identificación de los RIs en las inmunodetecciones. Decidimos usar la estirpe DH5 α F' que es *recA*-, con lo que se evita la formación de multímeros (Martin-Parras et al., 1991, 1992). Esta estirpe porta la mutación *gyrA96* confirmando a la DNA girasa resistencia frente a la norfloxacin pero no altera el nivel de superenrollamiento (-) de los plásmidos (Zechiedrich et al., 1997). En distintos estudios se observa que el nivel de superenrollamiento (-) de los plásmidos en la estirpe W3110 es el mismo que en la estirpe DH5 α F' (Mayan-Santos et al., 2007; Zechiedrich et al., 2000) con lo que el uso de esta última es aceptable para nuestro estudio.

4.2.1. Análisis de los RIs de pBR-TerE@*StyI*, pBR-TerE@*AatII* y pBR-TerE@*DraI* aislados de células DH5 α F' mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa

Se analizaron los RIs de los tres plásmidos aislados de células DH5 α F' de *E. coli* en crecimiento exponencial y se confirmó, mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa, que, en cada uno de los casos, la horquilla de replicación se detiene al alcanzar

la secuencia *TerE*. En la Figura 26 se muestran las inmunodetecciones obtenidas y, a la derecha de cada una, su esquema interpretativo. La señal de la parte inferior derecha de todas las inmunodetecciones corresponde a las formas superenrolladas de los monómeros que no estaban replicando en el momento en el que se detuvo el cultivo, los CCCs (Martin-Parras et al., 1998; Schwartzman et al., 1990). Cuando estas moléculas sufren roturas de cadena sencilla durante la extracción del DNA dan lugar a moléculas relajadas, los OCs. Los CCCs también pueden sufrir roturas durante la primera dimensión y la segunda dimensión, apareciendo en las inmunodetecciones un rastro horizontal y vertical, respectivamente. Ambos rastros hacen que los CCCs formen un ángulo recto con los OCs. En el vértice de ese ángulo recto se detecta una señal discreta y tenue correspondiente a moléculas que sufrieron roturas de cadena sencilla entre la primera y la segunda dimensión. En la inmunodetección de pBR-TerE@*StyI* se observa un segundo ángulo recto desplazado ligeramente hacia la izquierda y hacia arriba del primero, correspondiente a los CCCs y OCs parcialmente replicados con la horquilla detenida en el sitio *TerE* de pBR-TerE@*StyI* denominados CCRI (intermediarios de replicación covalentemente cerrados) y OCRI (intermediarios de replicación relajados). En los otros dos plásmidos los CCRI describen un arco. En el caso de pBR-TerE@*AatII*, el arco se extiende desde la parte superior izquierda de la inmunodetección hasta la zona inferior y a la derecha de los OCs. En pBR-TerE@*DraI* el arco ocupa la zona central de la inmunodetección y se sitúa por encima de los OCs. Cada uno de los elementos de esos arcos es un topoisómero con distinto grado de superenrollamiento y, tanto su movilidad electroforética como su abundancia relativa, aumentan de forma directamente proporcional a su superenrollamiento.

Comparando las tres inmunodetecciones se observa que las señales correspondientes a las formas no replicadas (CCCs y OCs) presentan la misma movilidad electroforética ya que los tres plásmidos tienen tamaños muy similares (pBR-TerE@*StyI* 4385 pb, pBR-TerE@*AatII* 4449 pb, y pBR-TerE@*DraI* 4433 pb). En cambio, la movilidad de las moléculas parcialmente replicadas varía de acuerdo con el tamaño de la porción replicada (Olavarrieta y cols., 2002c). Por ello, la movilidad electroforética de los OCRI varía en los tres plásmidos ya que sus masas son 5525 pb en pBR-TerE@*StyI*, 7118 pb en pBR-TerE@*AatII* y 7979 pb en pBR-TerE@*DraI*. Dicho tamaño condiciona, además de la migración, la forma de los arcos de CCRI y permite distinguir si se trata de

un plásmido con la horquilla detenida en *StyI*, *AatII* o *DraI*. En pBR-TerE@*StyI* el arco de CCRIs, representado en rojo en el diagrama interpretativo, aparece sólo como unos pocos topoisómeros, cerca de los CCCs. Sin embargo, en pBR-TerE@*AatII* los CCRIs aparecen como un arco formado por una serie de varios topoisómeros que se extienden desde un punto con una movilidad en segunda dimensión ligeramente mayor que las OCs hasta los OCRIs. En pBR-TerE@*DraI* el arco de CCRIs se visualiza como una serie de topoisómeros que se extienden desde un punto con una movilidad en segunda dimensión ligeramente inferior a las OCs hasta los OCRIs. En este caso, el arco de topoisómeros muestra una inflexión para las últimas moléculas escasamente torsionadas.

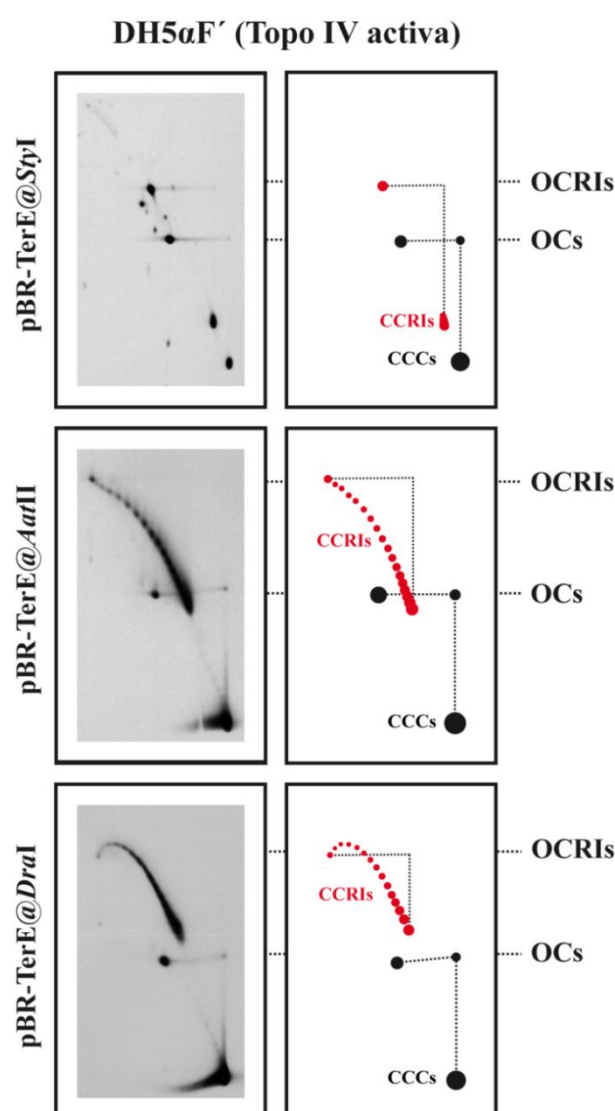


Figura 26. Inmunodetecciones correspondientes a los geles bidimensionales de las formas intactas de los plásmidos pBR-TerE@*StyI*, pBR-TerE@*AatII* y pBR-TerE@*DraI* aisladas de células DH5αF' de *E. coli*. A la derecha de cada inmunodetección se muestra un esquema interpretativo en donde las señales de las formas no replicadas se representan en negro y las señales de las moléculas parcialmente replicadas se representan en rojo.

4.2.2. Análisis de los RIs de pBR-TerE@*StyI*, pBR-TerE@*AatII* y pBR-TerE@*DraI* aislados de células parE10 mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa

En la Figura 27 se muestran las inmunodetecciones correspondientes al análisis mediante electroforesis bidimensional de RIs de los tres plásmidos crecidos en células parE de *E.coli*. La estirpe parE10 posee una mutación termosensible en el gen *parE*, de manera que a la temperatura permisiva de 30 °C la Topo IV está activa pero a la temperatura restrictiva de 43 °C se inactiva. Una vez que los cultivos alcanzaron la fase de crecimiento exponencial se cambiaron a la temperatura restrictiva (43 °C) durante una hora. La movilidad electroforética de las formas no replicadas para los tres plásmidos no muestra diferencias con respecto a la obtenida de las células DH5 α F' (Figura 26) si bien se sabe que los plásmidos no replicados aislados de células con la Topo IV inactiva están ligeramente más negativamente superenrollados que los aislados de células con la Topo IV activa. En el plásmido pBR322 aislado de células con Topo IV, la moda es el topoisómero $\Delta Lk = -27$ mientras que aislado de células sin Topo IV es -31 (Mayan-Santos et al., 2007; Zechiedrich et al., 2000). Aproximadamente el 20% de los plásmidos escapan al bloqueo de la replicación de *Ter*-Tus y pueden completar la replicación, aunque sin Topo IV son incapaces de segregar, acumulándose moléculas encadenadas (Adams et al., 1992; Lopez et al., 2012). En las tres inmunodetecciones se aprecian los tres tipos de encadenados: CatAs (muy minoritarios debido a que su formación se debe a una excesiva rotura en el proceso de extracción del DNA), CatBs y CatCs representados como arcos verdes en los esquemas interpretativos. Estas señales sirven como control para confirmar la inhibición de la Topo IV. En cuanto a los arcos de CCRIs de pBR-TerE@*StyI* y pBR-TerE@*DraI* no se observan diferencias significativas al compararlos con los aislados de las células DH5 α F' de la Figura 26. Sin embargo, el patrón correspondiente al arco de CCRIs de pBR-TerE@*AatII* es significativamente diferente. La mayoría de los topoisómeros muestran una elevada movilidad electroforética durante la segunda dimensión. Esta observación indica que, al menos para pBR-TerE@*AatII*, los CCRIs aislados de células parE10 (con la Topo IV inactiva *in vivo*) están más torsionados que los aislados de células DH5 α F' (con la Topo IV activa *in vivo*).

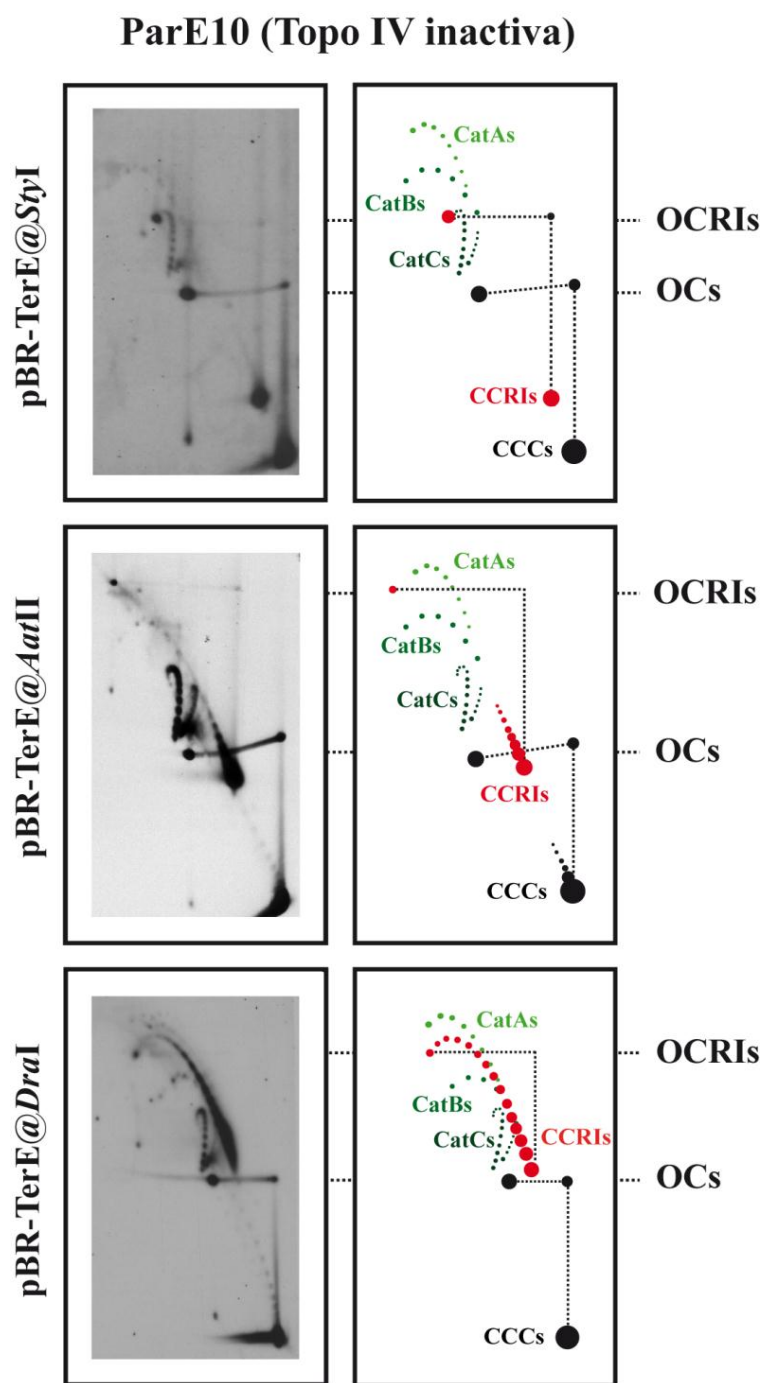


Figura 27. Inmunodetecciones correspondientes a los geles bidimensionales de las formas intactas de los plásmidos pBR-TerE@*StyI*, pBR-TerE@*AatII* y pBR-TerE@*DraI* aislados de células *parE10* de *E. coli* crecidas durante 1 hora a 43 °C una vez alcanzada la fase de crecimiento exponencial. A la derecha de cada inmunodetección se muestra un esquema interpretativo en donde las señales de las formas no replicadas se representan en negro, las señales de las moléculas parcialmente replicadas en rojo y los tres tipos de encadenados en verde.

4.2.3. Análisis de los RIs de pBR-TerE@*StyI*, pBR-TerE@*AatII* y pBR-TerE@*DraI* aislados de células DH5 α F' en presencia de Chl en segunda dimensión

Para comparar con mayor resolución la tensión torsional de todos los RIs, se analizaron los CCRI en geles bidimensionales de agarosa en donde la segunda dimensión se realizó en presencia de 5 μ g/ml de Chl. La elección de dicha concentración se llevó a cabo teniendo en cuenta resultados de trabajos previos (Martinez-Robles et al., 2009; Olavarrieta et al., 2002c). Como se mencionó en la Introducción, la Chl es una molécula planar de pequeño tamaño que se intercala entre las hélices del DNA, provocando un desenrollamiento parcial de la molécula en el sitio en el que se intercala. Esta intercalación, por tanto, cambia el Tw de la molécula. En el caso de los plásmidos bacterianos que están (-) superenrollados, este desenrollamiento lleva una disminución del superenrollamiento (-) hasta que los plásmidos se relajan. A partir de ese momento, la incorporación de cantidades crecientes del agente intercalante hace que los plásmidos adquieran superenrollamiento (+) (Bauer and Vinograd, 1968; Olavarrieta et al., 2002c).

A diferencia de lo que ocurre con las formas no replicativas, cuando se analizan en geles bidimensionales RIs con las horquillas detenidas, los CCRI no adquieren superenrollamiento (+). En estos intermediarios se produce un retroceso de las horquillas de replicación generando moléculas con un cuarto brazo (Fierro-Fernandez et al., 2007a; Fierro-Fernandez et al., 2007b; Olavarrieta et al., 2002c; Postow et al., 2001). Los CCRI con horquillas en retroceso muestran la misma movilidad electroforética que los OCRI. La Chl no afecta a la movilidad electroforética de los OCs y OCRI puesto que no son dominios topológicamente cerrados y por tanto, no hay superenrollamiento que pueda variar debido al agente intercalante. En nuestro caso, la Chl debería afectar de forma diferente a las moléculas que no han replicado que a las parcialmente replicadas y, dentro de este último grupo, debería afectar más a pBR-TerE@*StyI* que a pBR-TerE@*DraI* ya que el intercalamiento sólo tiene efecto en la región superenrollada de los RIs (Lopez et al., 2012; Olavarrieta et al., 2002c), siendo ésta mayor en el caso del primer plásmido.

En la Figura 28 se ilustran las tres inmunodetecciones obtenidas de los tres plásmidos aislados de células DH5 α F' y analizados por electroforesis bidimensional. A la derecha de cada inmunodetección se añade un esquema interpretativo. Como puede verse,

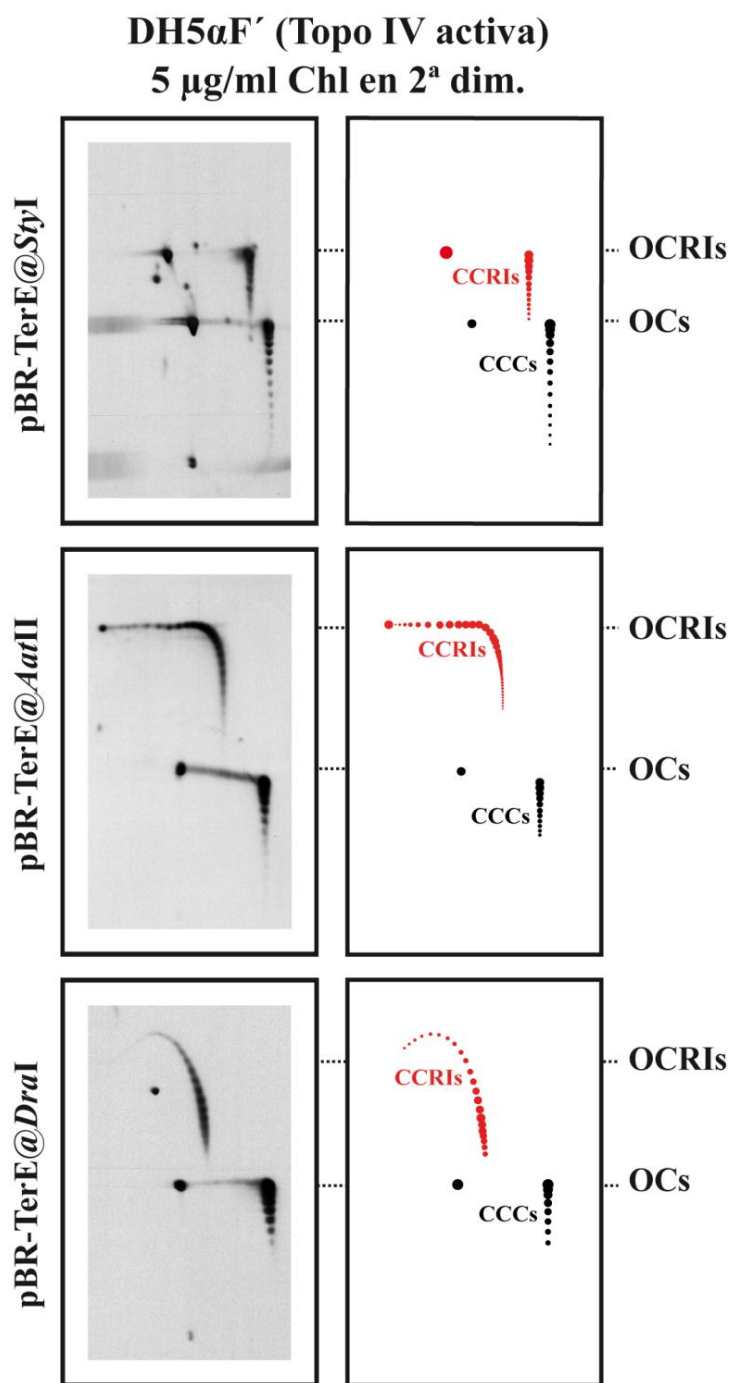


Figura 28. Inmunodetecciones correspondientes a los geles bidimensionales de las formas intactas de los plásmidos pBR-TerE@StyI, pBR-TerE@AatII y pBR-TerE@DraI aislados de células DH5 α F' de *E. coli* en los que la segunda dimensión transcurrió en presencia de 5 μ g/ml de Chl. A la derecha de cada inmunodetección se muestra un esquema interpretativo en donde las señales de las formas no replicadas se representan en negro y las señales de las moléculas parcialmente replicadas se representan en rojo.

el efecto de la Chl en las moléculas no replicadas, CCCs, fue similar en los tres casos. Sin embargo, el efecto en la forma de los arcos correspondientes a CCRIs fue diferente en cada plásmido. Para pBR-TerE@*StyI*, la movilidad electroforética de los CCRIs cambia de una manera similar a la que se observa en los CCCs. Teniendo en cuenta que los CCRIs no pueden recuperar movilidad electroforética después de haber perdido todo su superenrollamiento (-) nativo (Fierro-Fernandez et al., 2007b; Olavarrieta et al., 2002c), se puede concluir que la mayoría de los CCRIs de pBR-TerE@*StyI* están próximos a un $\Delta Lk = 0$. Para pBR-TerE@*AatII*, el arco de CCRIs cambia su forma drásticamente, pasando de un arco curvo en ausencia de Chl (Figura 26) a un arco con un ángulo agudo en presencia del agente intercalante. En el caso de pBR-TerE@*DraI*, el cambio en la forma del arco es sutil.

4.2.4. Análisis de los RIs de pBR-TerE@*StyI*, pBR-TerE@*AatII* y pBR-TerE@*DraI* aislados de células parE10 en presencia de Chl en segunda dimensión

Analizamos en presencia de Chl durante la segunda dimensión, los RIs de los tres plásmidos aislados, esta vez, de células parE10 de *E. coli* en las que se había inactivado *in vivo* la Topo IV cambiando el cultivo a la temperatura restrictiva de 43 °C.

Las inmunodetecciones se muestran en la Figura 29 acompañadas a la derecha de su correspondiente esquema ilustrativo. El efecto de la Chl en las moléculas no replicadas, CCCs, fue similar en los tres casos. Los CCRIs de pBR-TerE@*StyI* no llegan a estar completamente relajados y la mayoría de los topoisómeros muestran una movilidad electroforética mayor que los OCRIs. En el caso de pBR-TerE@*AatII*, la forma del arco de CCRIs no es tan abrupta como ocurre en las moléculas aisladas de células DH5 α F' que se muestran en la Figura 28. La mayoría de los CCRIs permanecen todavía torsionados y, por tanto, con una movilidad electroforética superior a la de los OCRIs. Por último, en pBR-TerE@*DraI*, el cambio en la forma del arco fue, de nuevo, sutil. Todas estas observaciones sugieren que los CCRIs aislados de parE10 están más torsionados que los aislados de DH5 α F'. Debido al tamaño de las regiones no replicadas el efecto de la Chl es notable para pBR-TerE@*StyI*, menos aparente para pBR-TerE@*AatII* y casi insignificante para pBR-TerE@*DraI*.

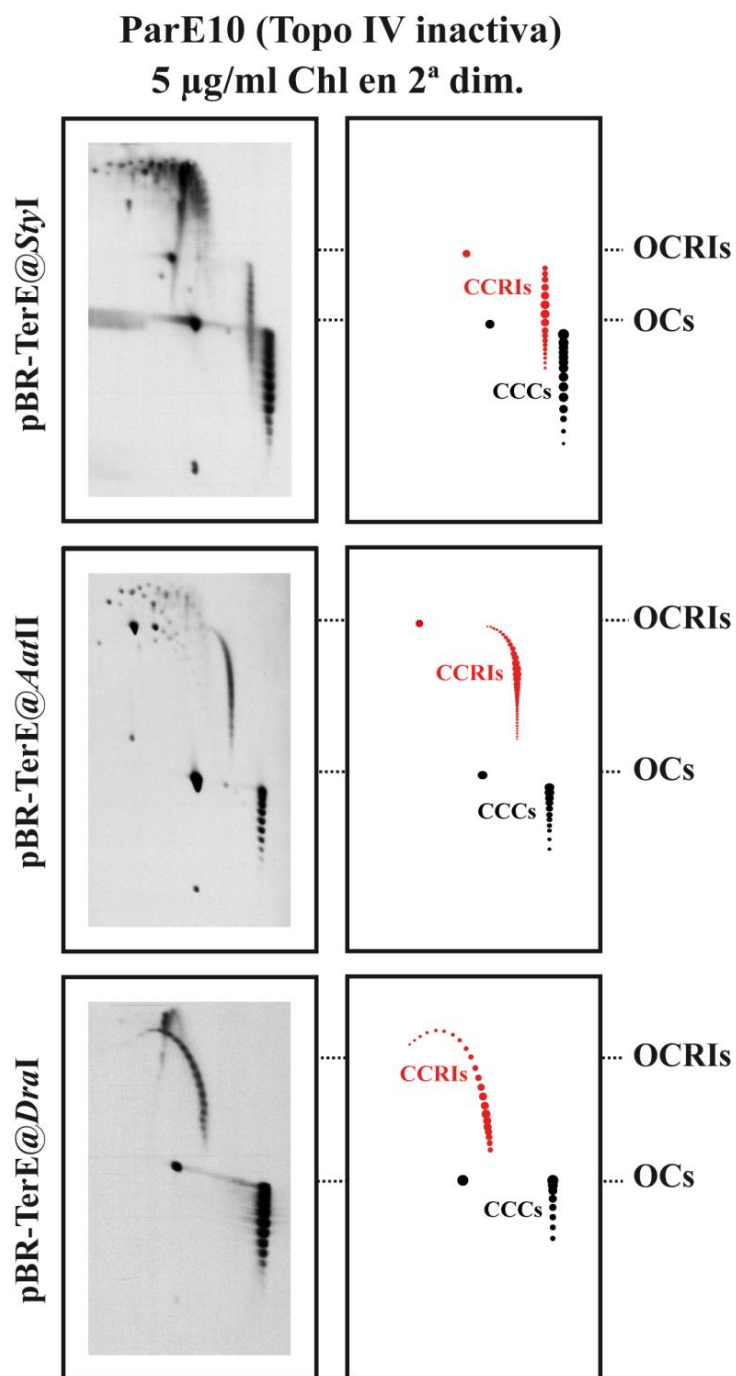


Figura 29. Inmunodetecciones correspondientes a los geles bidimensionales de las formas intactas de los plásmidos pBR-TerE@StyI, pBR-TerE@AatII y pBR-TerE@DraI aislados de células parE10 de *E. coli* crecidas durante 1 hora a 43 °C en los que la segunda dimensión transcurrió en presencia de 5 µg/ml de Chl. A la derecha de cada inmunodetección se muestra un esquema interpretativo en donde las señales de las formas no replicadas se representan en negro y las señales de las moléculas parcialmente replicadas se representan en rojo.

4.2.5. Comparación de los RIs anudados de los plásmidos pBR-TerE@*StyI*, pBR-TerE@*AatII* y pBR-TerE@*DraI* aislados de células DH5 α F' y parE10

Recientemente se ha demostrado que la tensión torsional reduce la probabilidad de que la Topo IV genere nudos en RIs plasmídicos (Lopez et al., 2012; Schwartzman et al., 2013a; Witz et al., 2011a, b; Witz and Stasiak, 2010). Por otro lado, el nivel de anudamiento del DNA es proporcional a la masa molecular (Olavarrieta et al., 2002b). Para analizar, con otro abordaje, si los CCRIs de plásmidos aislados de parE10 están más torsionados que los aislados de DH5 α F', se decidió medir el anudamiento del DNA en la región replicada de los RIs aislados de ambas estirpes. Para identificar los nudos, digerimos los RIs de los tres plásmidos con la enzima *AlwNI* que los corta fuera de la región replicada (véanse las Figuras 6, 7 y 8 en Materiales y Métodos). Al cortar fuera de la burbuja que se acumula cuando la horquilla se detiene al llegar a la secuencia *TerE*, las moléculas resultantes son moléculas lineales de DNA conteniendo una burbuja interna. En una electroforesis bidimensional se detectan, además, unas señales discretas a modo de cuentas de collar que corresponden a burbujas anudadas o RIs anudados (Santamaria et al., 2000a; Sogo et al., 1999; Viguera et al., 1996). En la Figura 30 se muestra el resultado de la electroforesis bidimensional para cada uno de los tres plásmidos aislados de la estirpe DH5 α F' (con la Topo IV activa *in vivo*) y en la Figura 31 se muestra el resultado de los plásmidos aislados de la estirpe ParE10 crecidos a la temperatura restrictiva durante la última hora (con la Topo IV inactiva *in vivo*). En todos los casos, en la parte inferior derecha de las inmunodetecciones aparece una señal intensa correspondiente a las moléculas lineales. La señal que le sigue en intensidad y que está desplazada a la izquierda se debe a RIs acumulados con una burbuja interna no anudada (Santamaria et al., 1998; Santamaria et al., 2000a; Viguera et al., 1996). Las señales en forma de cuentas de collar que aparecen hacia la derecha de los RIs acumulados corresponden a burbujas anudadas (Santamaria et al., 2000a; Sogo et al., 1999; Viguera et al., 1996). Como se puede observar, la movilidad electroforética de las señales de burbujas anudadas difiere ligeramente para cada uno de los tres plásmidos. Esta señal se extiende a la derecha y hacia abajo de las burbujas acumuladas no anudadas en pBR-TerE@*StyI*, a la derecha y curvada por encima de las burbujas no anudadas en pBR-TerE@*AatII*, y a la derecha y aún más curvada hacia arriba en pBR-TerE@*DraI*. Esto confirma que durante la primera

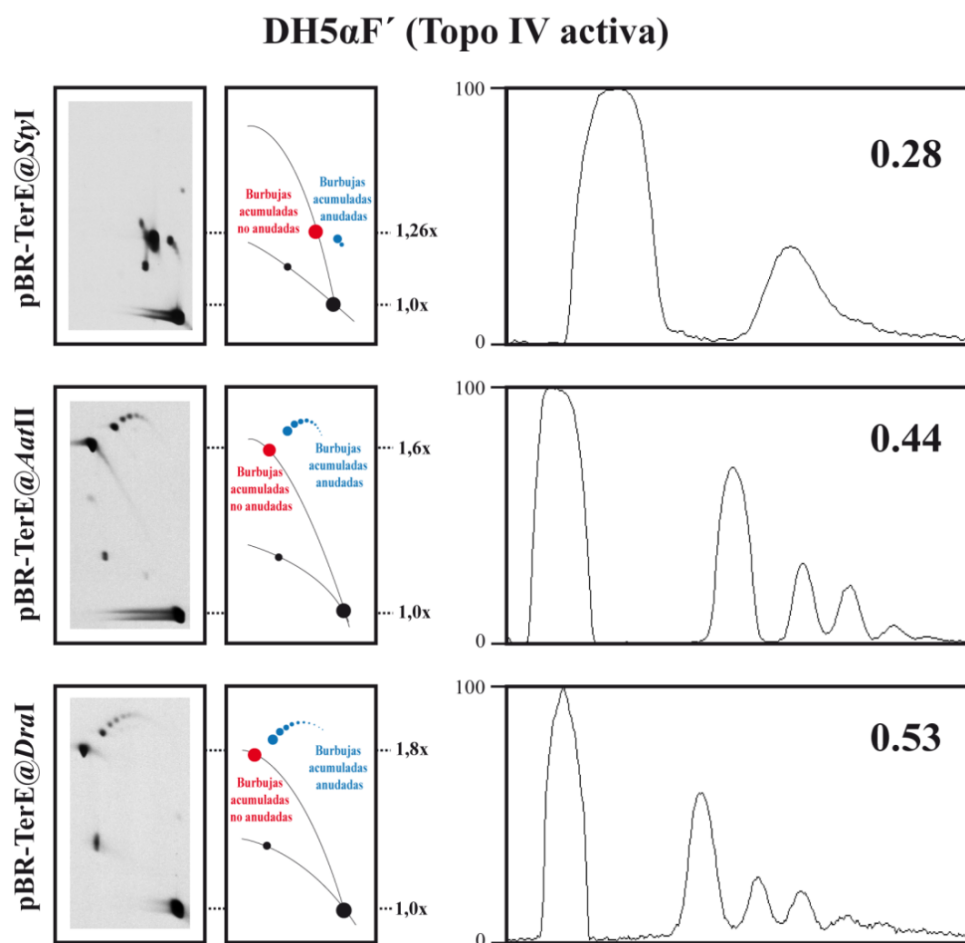


Figura 30. Análisis de los RIs de los plásmidos pBR-TerE@*StyI*, pBR-TerE@*AatII* y pBR-TerE@*DraI* aislados de células de células DH5 α F' de *E. coli* y digeridos con *AlwNI*. A la izquierda se muestran las inmunodetecciones de las electroforesis bidimensionales de cada plásmido junto con su esquema interpretativo. Las inmunodetecciones fueron escaneadas y la región donde migraron las burbujas no anudadas (en rojo) y anudadas (en azul) fue analizada por densitometría para determinar la proporción de estas últimas. Los perfiles densitométricos resultantes se muestran a la derecha con la proporción de burbujas anudadas en cada caso.

dimensión, en la que la electroforesis transcurre en un gel de baja concentración de agarosa y bajo voltaje, la movilidad de las burbujas anudadas depende de su masa. Sin embargo, durante la segunda dimensión, en la que la electroforesis transcurre en un gel de alta concentración de agarosa y a alto voltaje, la movilidad aumenta en función de su complejidad, es decir, en función del tamaño de la burbuja y del número de cruces que tengan los nudos de la misma (Olavarrieta et al., 2002a; Stasiak et al., 1996).

Las señales correspondientes a las burbujas anudadas y no anudadas se cuantificaron por densitometría (Lopez et al., 2012; Olavarrieta et al., 2002a). Los perfiles densitométricos se muestran a la derecha de cada inmunodetección.

ParE10 (Topo IV inactiva)

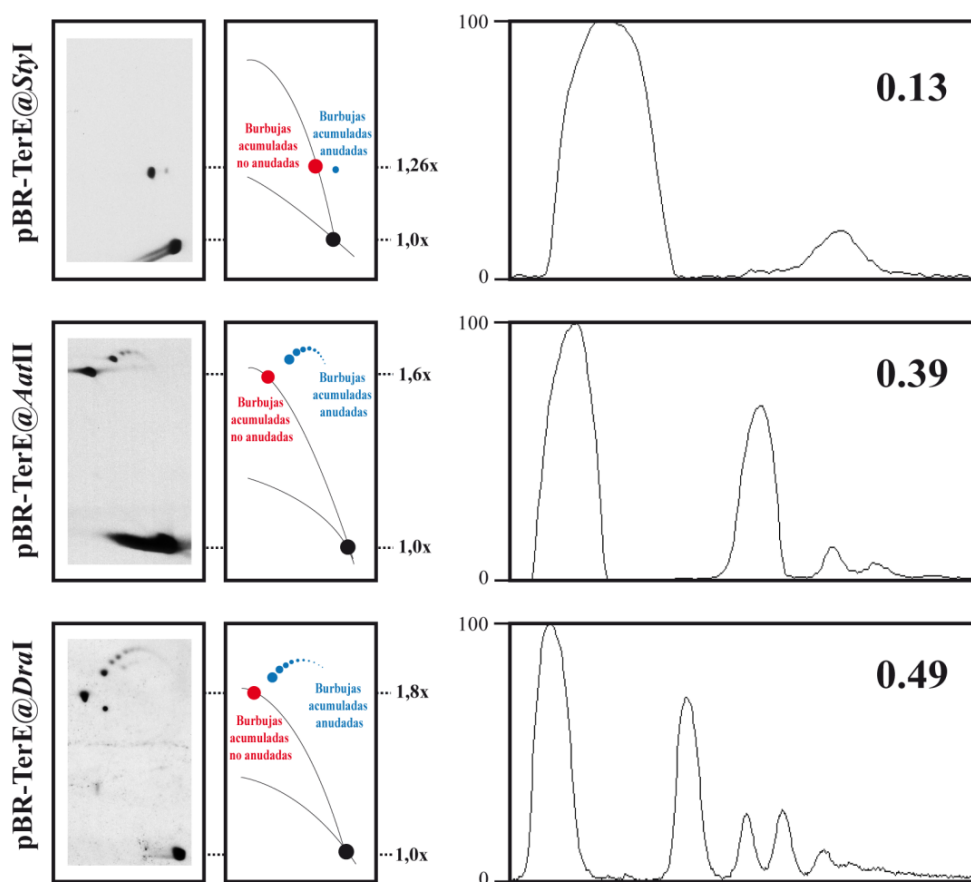


Figura 31. Análisis de los RIs de los plásmidos pBR-TerE@*StyI*, pBR-TerE@*AatII* y pBR-TerE@*DraI* aislados de células parE10 de *E. coli* crecidas durante 1 hora a 43 °C una vez alcanzada la fase de crecimiento exponencial y digeridos con *AlwNI*. A la izquierda se muestran las inmunodetecciones de las electroforesis bidimensionales de cada plásmido junto con su esquema interpretativo. Las inmunodetecciones fueron escaneadas y la región donde migraron las burbujas no anudadas (en rojo) y anudadas (en azul) fue analizada por densitometría para determinar la proporción de estas últimas. Los perfiles densitométricos resultantes se muestran a la derecha con la proporción de burbujas anudadas en cada caso.

Estos resultados demuestran que el número y complejidad de burbujas anudadas aumentan con el tamaño de la burbuja (Olavarrieta et al., 2002b): es mayor en el caso de pBR-TerE@*DraI* y menor en el de pBR-TerE@*StyI*. Además, comparando cada plásmido en ambas estirpes (DH5 α F' y parE10) se observa que el porcentaje de burbujas anudadas es mayor cuando el DNA es aislado de las células DH5 α F'. Dicho de otro modo, la inhibición de la Topo IV produce una ligera disminución de la señal de burbujas anudadas, indicando que el grado de pre-encadenamiento es mayor en los plásmidos aislados de las células parE10 que en los aislados de DH5 α F'.

4.3. Estudio de la replicación, segregación y transcripción de minicromosomas circulares y lineales en *S. cerevisiae*

Cuando las moléculas de DNA se separan mediante electroforesis, las moléculas circulares generan una serie de bandas correspondientes a formas superenrolladas y relajadas mientras que las moléculas lineales, carentes de superenrollamiento, dan lugar a una única banda. Recientemente, se ha observado que la naturaleza circular o lineal de los cromosomas afecta a procesos fundamentales del DNA como son su replicación y transcripción (Joshi et al., 2010). Además, el estrés topológico inducido por la replicación se ve influido por el tamaño de los cromosomas (Kegel et al., 2011). Por lo tanto, aunque las topoisomerasas son esenciales durante la replicación y transcripción del DNA (Brill and Sternglanz, 1988), es posible que minicromosomas lineales no necesiten topoisomerasas para replicar ni segregar. En el laboratorio se estableció un modelo con dos minicromosomas derivados de pRS316 en *S. cerevisiae*: uno en forma circular y otro en forma lineal. Estudiamos la replicación y segregación de esos minicromosomas en células sincronizadas de *S. cerevisiae*. (Kegel et al., 2011). Además, la estirpe de *S. cerevisiae* empleada tiene un sistema degrón inducible por temperatura (Dohmen et al., 1994) con el que podremos analizar las consecuencias de la eliminación de la Topo 2.

4.3.1. Construcción de minicromosomas artificiales circulares y lineales

Basándonos en trabajos previos sobre la construcción de cromosomas artificiales de levaduras o YACs (Murray and Szostak, 1983; Szostak and Blackburn, 1982) se construyeron dos cromosomas artificiales: uno circular -pYAC_MEM- (Figura 32A), y otro lineal -YAC_MEM- (Figura 32B). La construcción detallada se explica en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos. En resumen, el minicromosoma pYAC_MEM se generó a partir del minicromosoma circular pRS316 que contiene el origen de replicación ARS4, la secuencia de DNA centromérica CEN6 y el marcador de selección para auxotrofia *URA3*. En el sitio de restricción *XhoI* se clonó una región de 3,1 kb que contenía en los extremos repeticiones teloméricas de *Tetrahymena thermophila* y en el centro el gen de histidina (*HIS3*). Este fragmento se obtuvo mediante una digestión del minicromosoma pYAC-RC (Marchuk and Collins, 1988) con la enzima de restricción *XhoI*. Se añadieron dos

secuencias del fago λ , L1 y L2, a ambos lados de las repeticiones teloméricas para la posterior inmunodetección no radiactiva. Finalmente, el minicromosoma circular pYAC_MEM se digirió *in vitro* con la enzima de restricción *Bam*HI para obtener el minicromosoma lineal YAC_MEM.

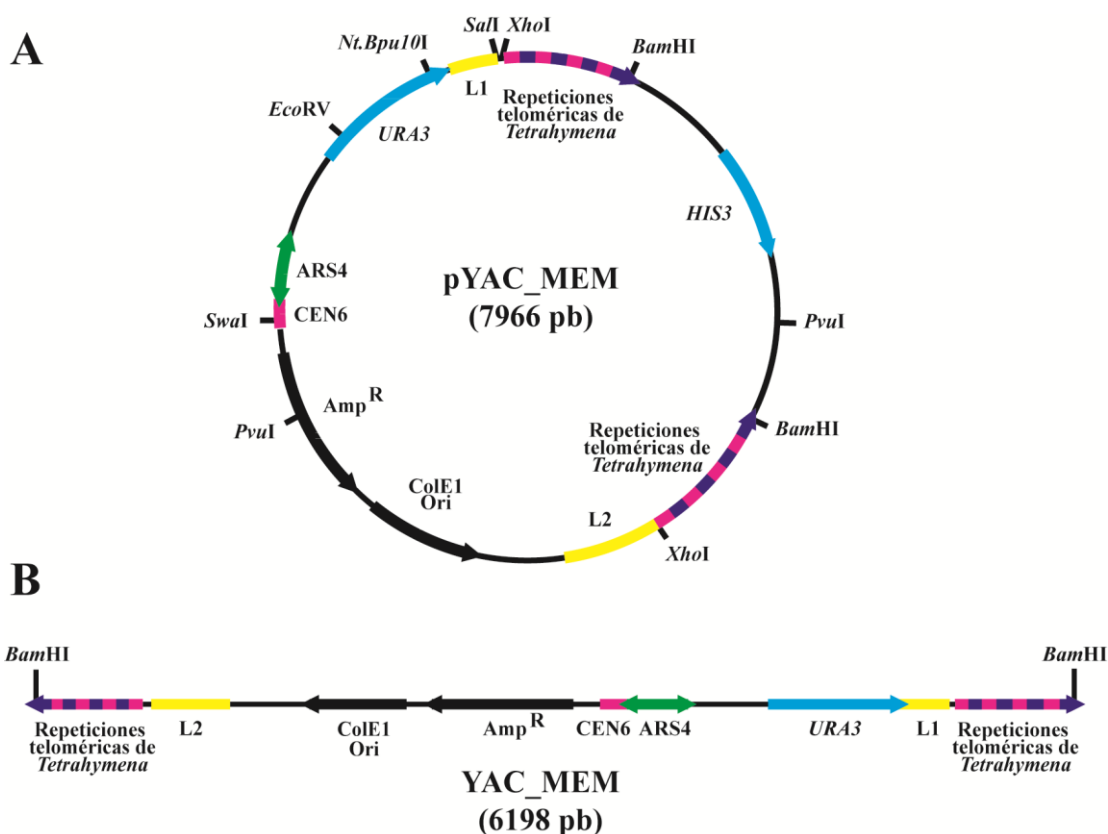


Figura 32. Mapas de los minicromosomas pYAC_MEM y YAC_MEM. Nombre, masa e ilustración esquemática de los elementos más relevantes y de los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción de pYAC_MEM (A) y de YAC_MEM (B).

Realizamos estudios de replicación y segregación en ambos minicromosomas (pYAC_MEM y YAC_MEM). Una vez obtenidas ambas construcciones en *E. coli* se utilizaron para transformar células de la estirpe top2-td de *S. cerevisiae* (Figura 33A). Dicha estirpe es portadora de una mutación de tipo degrón en la Topo 2, la cual permite su degradación en condiciones de crecimiento restrictivo (véase el apartado 3.2.2.1 de Materiales y Métodos). La tasa de transformación con la forma circular del minicromosoma fue de 5.600 colonias por μg de DNA mientras que para la forma lineal se obtuvieron 2.300 colonias por μg de DNA. Surgieron dificultades para obtener colonias con la forma lineal del minicromosoma debido a la tendencia a la recircularización de los

misimos (Enomoto et al., 1994). En el *Southern blot* de comprobación de la transformación con YAC_MEM (Figura 33B) se ilustra este problema. De las 11 colonias analizadas menos del 30% contenían la forma lineal intacta. Como control de transformación se utilizó el mismo minicromosoma aislado de *E. coli*. Finalmente, para evitar tener células con copias de nuestros minicromosomas integrados en el DNA genómico de las levaduras, se seleccionaron aquellas colonias en las que se comprobó que no tenían o tenían el menor posible DNA del minicromosoma comigrando con el DNA genómico de las levaduras. Se eligió la colonia número 5 de la transformación con pYAC_MEM mientras que para el caso del YAC_MEM se eligió la colonia número 2.

Con el YAC_MEM aislado de levaduras, se volvió a transformar la estirpe top2-td de levaduras y se comprobó que, en este caso, las 14 colonias estudiadas presentaban el minicromosoma en su estado lineal. No se detectó recombinación ni recircularización al transformar la levadura con el minicromosoma lineal aislado directamente de levaduras (Figura 33C).

El DNA se organiza de manera diferente en procariotas y eucariotas y esto afecta a la topología del mismo (Germond et al., 1975). Para estudiar estas diferencias se realizó un *Southern* comparativo de las movilidades electroforéticas de las formas circulares y lineales de los minicromosomas aislados de *E. coli* y *S. cerevisiae*. Como se puede observar en el gel unidimensional de la Figura 33D, los minicromosomas presentan un comportamiento electroforético distinto dependiendo de su procedencia. Así, el cromosoma circular aislado de *E. coli* presenta mayor movilidad electroforética con respecto al cromosoma circular aislado de *S. cerevisiae*. Este aumento en la movilidad electroforética es debido al mayor superenrollamiento (-) que presentan los plásmidos bacterianos con respecto a sus homólogos en levaduras (Mayan-Santos et al., 2007). Por otro lado, la diferencia de movilidad observada en el cromosoma lineal, es consecuencia de la adición de repeticiones teloméricas por parte de la telomerasa de la levadura (Shampay et al., 1984), incrementando su tamaño y migrando, por tanto, a una altura superior a la correspondiente para la forma lineal de *E. coli*.

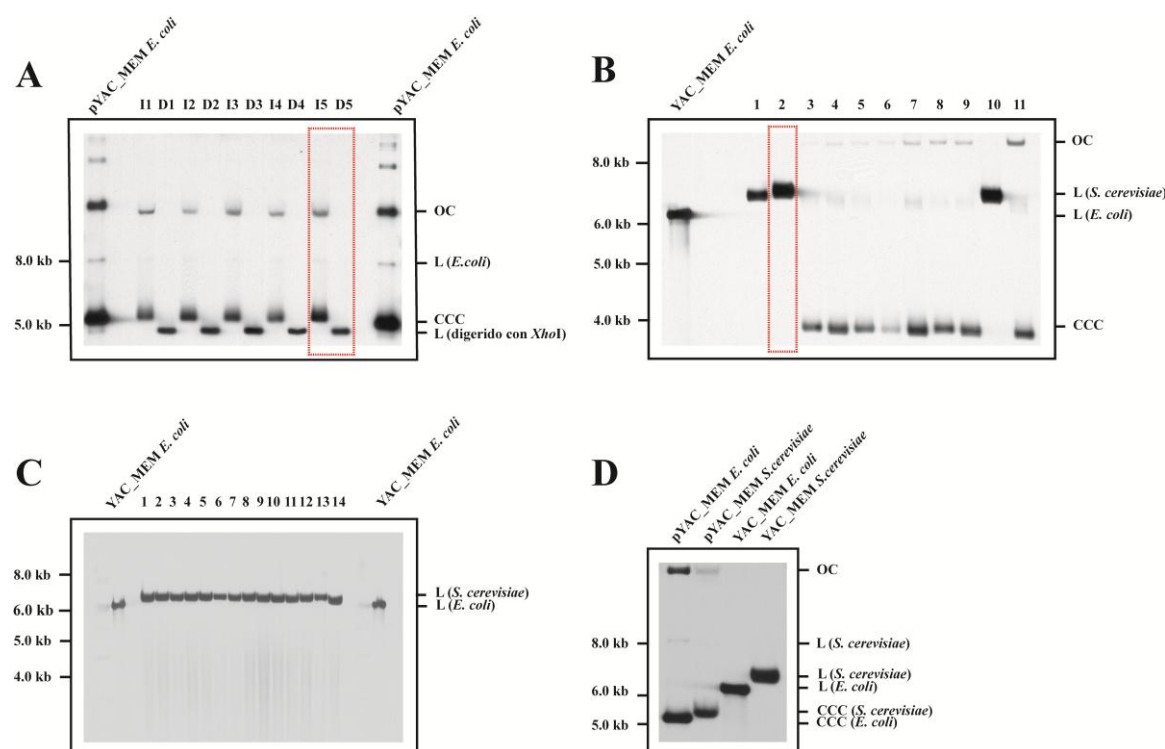


Figura 33. Estudio de la transformación de células de *E. coli* y *S. cerevisiae* con pYAC_MEM y YAC_MEM. **A:** Inmunodetección del *Southern* de comprobación de la transformación de células de la estirpe top2-td con pYAC_MEM. Se examinaron 5 colonias crecidas en placa en condiciones de auxotrofia para el gen *URA3*. El DNA extraído se digirió con la enzima de restricción *Xho*I (I = DNA intacto, D = DNA digerido). Como control se utilizó pYAC_MEM aislado de *E. coli*. **B:** Inmunodetección del *Southern* de comprobación de la transformación de células de la estirpe top2-td con YAC_MEM extraído de *E. coli*. Se examinó el DNA de 11 colonias crecidas en placa en condiciones de auxotrofia para el gen *URA3*. Como control se utilizó YAC_MEM aislado de *E. coli*. **C:** Inmunodetección del *Southern* de comprobación de la transformación de células de la estirpe top2-td con el minicromosoma YAC_MEM extraído de *S. cerevisiae*. Se examinaron 14 colonias crecidas en condiciones de auxotrofia para el gen *URA3*. Como control se utilizó YAC_MEM aislado de *E. coli*. **D:** Inmunodetección del *Southern* comparativo de las transformaciones de células de *E. coli* y *S. cerevisiae* con las formas circulares y lineales de los minicromosomas.

4.3.2. Estudio del ciclo celular de la estirpe top2-td de *S. cerevisiae* transformada con los minicromosomas pYAC_MEM y YAC_MEM en presencia y ausencia de Topo 2

Para estudiar los RIs y los productos de segregación (en presencia y ausencia de Topo 2) de los minicromosomas presentes en *S. cerevisiae* fue necesario sincronizar las levaduras. Los cultivos celulares en fase exponencial se sincronizaron en G1 con α -factor y se liberaron en fase S en condiciones permisivas o restrictivas. Con el objeto de comprobar la sincronía y la entrada en fase S, se recogieron alícuotas de las células en cultivo a distintos tiempos (0, 20, 40, 60 y 80 minutos) después de la liberación en la fase S. A continuación, se tiñeron con SYTOX®Green y se analizaron por citometría de flujo (Figura 34). Sólo se muestran las series correspondiente a las células transformadas con el minicromosoma circular, ya que no se observaron diferencias a nivel de ciclo celular entre la estirpe transformada con pYAC_MEM y con YAC_MEM. Los resultados obtenidos confirman trabajos anteriores (Baxter et al., 2011) indicando que en presencia de Topo 2 (condiciones permisivas) se detecta a los 20 minutos la progresión en la fase S, acumulándose gradualmente células con contenido 2C. En ausencia de Topo 2 (condiciones restrictivas) se aprecia un retraso en la entrada en fase S, tal como se observa al comparar el perfil con el de las células con Topo 2 después de 20 minutos. Sin embargo, este retraso se compensa y no se detectan diferencias significativas en el minuto 40. A los 80 minutos, las células creciendo en condiciones restrictivas presentan contenidos en DNA ligeramente mayores que las células que crecen en condiciones permisivas. Esto puede deberse a defectos en la citoquinesis y a la consiguiente aparición de células multinucleadas. Estos experimentos confirman que las células de levadura transformadas con los minicromosomas son capaces de completar la fase S en ausencia de Topo 2 (Baxter and Diffley, 2008; Kegel et al., 2011).

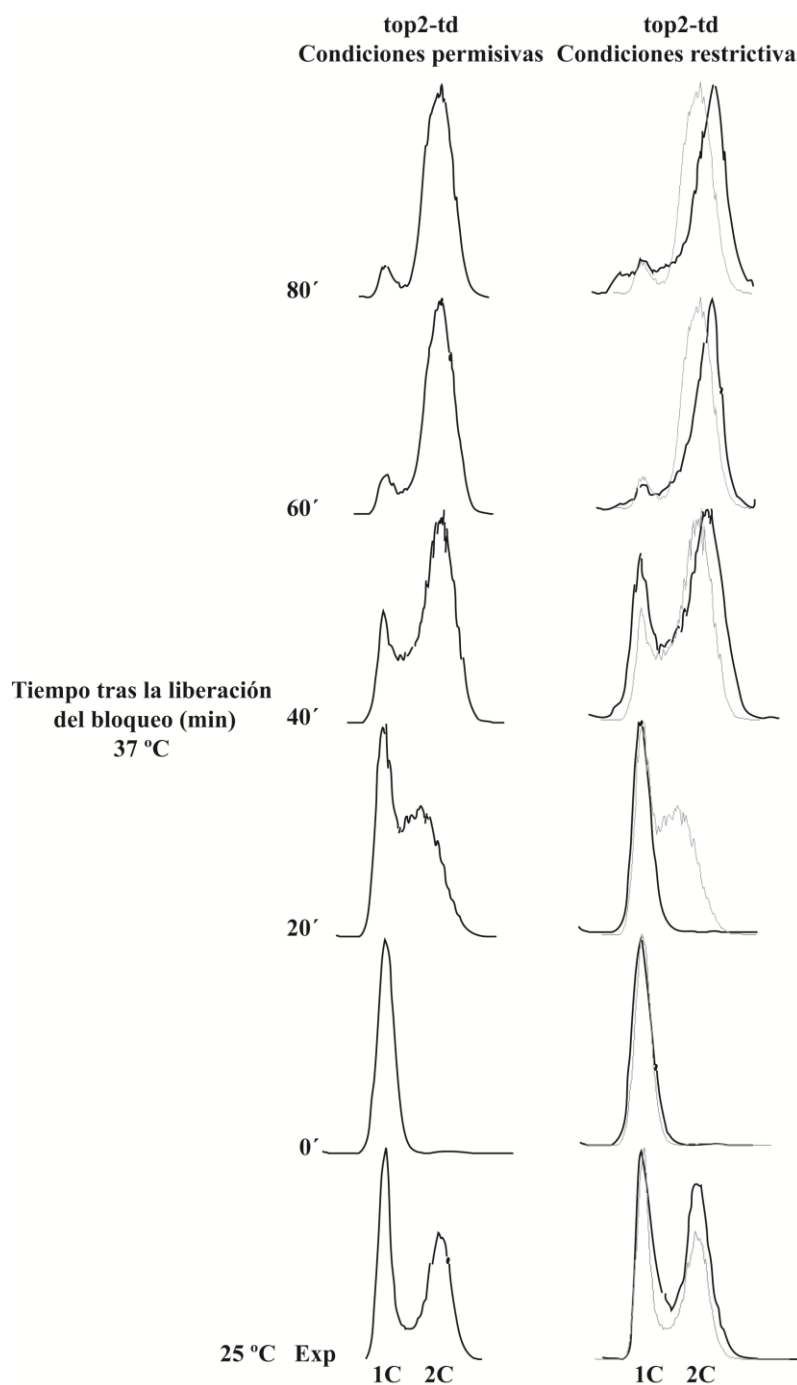


Figura 34. Estudio de la sincronización celular y progresión en la fase S de la estirpe top2-td en presencia y en ausencia de Topo 2. Las células de la estirpe top2-td transformadas con pYAC_MEM en crecimiento exponencial se bloquearon con α -factor en la fase G1 del ciclo celular y se liberaron de forma sincrónica a la fase S en presencia (perfil izquierdo) y ausencia (perfil derecho) de Topo 2. Se recogieron muestras cada 20 minutos después de la liberación, se fijaron con etanol y se analizaron por citometría de flujo en presencia de SYTOX®Green. Se muestran los perfiles obtenidos; para una mejor comparación los perfiles de las células crecidas en condiciones permisivas se indican en color gris bajo los perfiles de las células crecidas en condiciones restrictivas.

4.3.3. Análisis de la estabilidad mitótica y del número de copias de pYAC_MEM y YAC_MEM en *S. cerevisiae*

Los cromosomas de pequeño tamaño son inestables en levaduras (Murray et al., 1986; Murray and Szostak, 1983; Szostak, 2010). Además, una pérdida de la función del centrómero convierte un elemento extracromosómico de copia única en un elemento multicopia (Enomoto et al., 1994).

Para determinar el número de copias de ambos minicromosomas después de más de 30 generaciones tras la transformación, se comparó, por densitometría, la señal generada por un gen cromosómico de copia única (*URA3*) con el mismo gen presente en los elementos extracromosómicos. En la Figura 35 se muestran los fragmentos de DNA extracromosómico (pYAC_MEM y YAC_MEM) y genómico digeridos con *Bam*HI y *Xho*I analizados por electroforesis unidireccional. La inmunodetección obtenida de la electroforesis unidimensional fue analizada por densitometría. Los perfiles densitométricos de las bandas correspondientes a los fragmentos analizados se muestran en la parte inferior de la Figura 35. Se realizaron 3 análisis adicionales (no mostrados) con diferentes combinaciones de enzimas y la proporción obtenida del número de copias por célula fue de 1 a 2 para pYAC_MEM (la media fue de 1,4) y de 3 a 4 copias para YAC_MEM (media de 3,1).

Para comprobar si el aumento del número de copias del minicromosoma lineal se debía a una pérdida de la función del centrómero CEN6 (Enomoto et al., 1994), se estudió la estabilidad mitótica de los minicromosomas pYAC_MEM y YAC_MEM en la estirpe top2-td de *S.cerevisiae* durante 17 generaciones, tal y como se describe en el apartado 3.7 de Materiales y Métodos. Se observó que los minicromosomas circulares se conservan en un 60% de las colonias mientras que los minicromosomas lineales en un 47%. Como control se estudió la estabilidad mitótica de plásmidos sin centrómero (pBB6) observándose que en la generación 10 sólo se conservan un 13%.

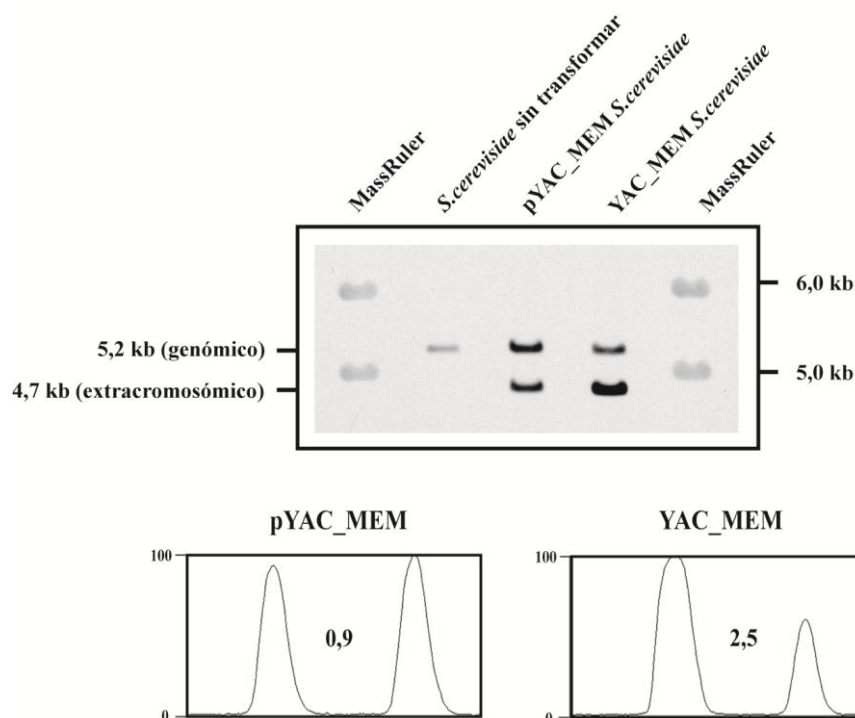


Figura 35. Estudio del número de copias de pYAC_MEM y YAC_MEM en *S. cerevisiae*. Immunodetección del *Southern* para el análisis de los fragmentos analizados después de la digestión con *Bam*HI y *Xho*I mediante la sonda *URA3*. La inmunodetección fue escaneada y las bandas correspondientes al fragmento de los minicromosomas y al fragmento del DNA genómico fueron analizadas por densitometría. Los perfiles densitométricos y la proporción del número de copias se muestran debajo.

Los resultados obtenidos confirman otros publicados previamente (Mann and Davis, 1986) e indican que, aunque los centrómeros son menos eficientes en los minicromosomas lineales, una proporción significativa de células mantienen copias de ambos minicromosomas de forma extracromosómica.

4.3.4. Análisis de los RIs de pYAC_MEM y YAC_MEM

Para examinar la replicación de los minicromosomas, teniendo en cuenta que las células top2-td sincronizadas con α -factor completan la fase S 60 minutos después de su liberación (Baxter et al., 2011), decidimos recoger las células en el minuto 40 tras la liberación. Se aisló el DNA y se analizaron las formas intactas y digeridas por electroforesis bidimensional.

4.3.4.1. Análisis de los RIs de pYAC_MEM

Para el estudio de los RIs del minicromosoma circular, el DNA extraído se digirió con diferentes combinaciones de enzimas de restricción y se examinó por electroforesis bidimensional. En la Figura 32A se representa el mapa del pYAC_MEM sobre el que se indican los elementos más relevantes y los sitios de reconocimiento de las enzimas *Bam*HI, *Sal*I, *Swa*I, *Eco*RV y *Pvu*I. Mediante las distintas combinaciones de enzimas, se generaron 6 fragmentos de estudio cuyos mapas se detallan en la parte inferior de la Figura 36.

Con el fin de analizar la replicación de dichos fragmentos se realizaron hibridaciones con las sondas L1 y L2 y se dividieron en dos grupos: los que contenían el ARS, lo que permitió realizar el análisis de la iniciación y progresión de las horquillas de replicación (Figura 37 A, B, C y D), y los que carecían de este elemento, lo que permitió el estudio de la progresión y terminación de las horquillas de replicación (Figura 37 E y F).

El fragmento pYAC_MEM *Bam*HI-*Bam*HI (Figura 37A) hibridado con la sonda L2 permitió examinar los patrones generados de los RIs de 6198 pb. En la Figura 37A se muestra la inmunodetección de la electroforesis bidimensional correspondiente al fragmento *Bam*HI-*Bam*HI realizada con la sonda L2 así como el diagrama interpretativo de las señales observadas. En color rojo se representa el arco de burbujas, en verde el arco de Y simples, en azul el arco de Y dobles, en morado el arco de recombinantes y en negro el arco de lineales.

Con el fin de interpretar el significado de las señales se utilizó el programa de simulación *2Dgels* (Viguera et al., 1998). Este programa permite simular los patrones que generan los RIs de un fragmento determinado cuando se analizan por electroforesis bidimensional en geles de agarosa. Igualmente, permite predecir la forma de los RIs responsables de unos patrones específicos observados en una inmunodetección. Es esta última herramienta del programa la que usamos para averiguar cómo replican pYAC_MEM y YAC_MEM en *S. cerevisiae* en presencia de Topo 2.

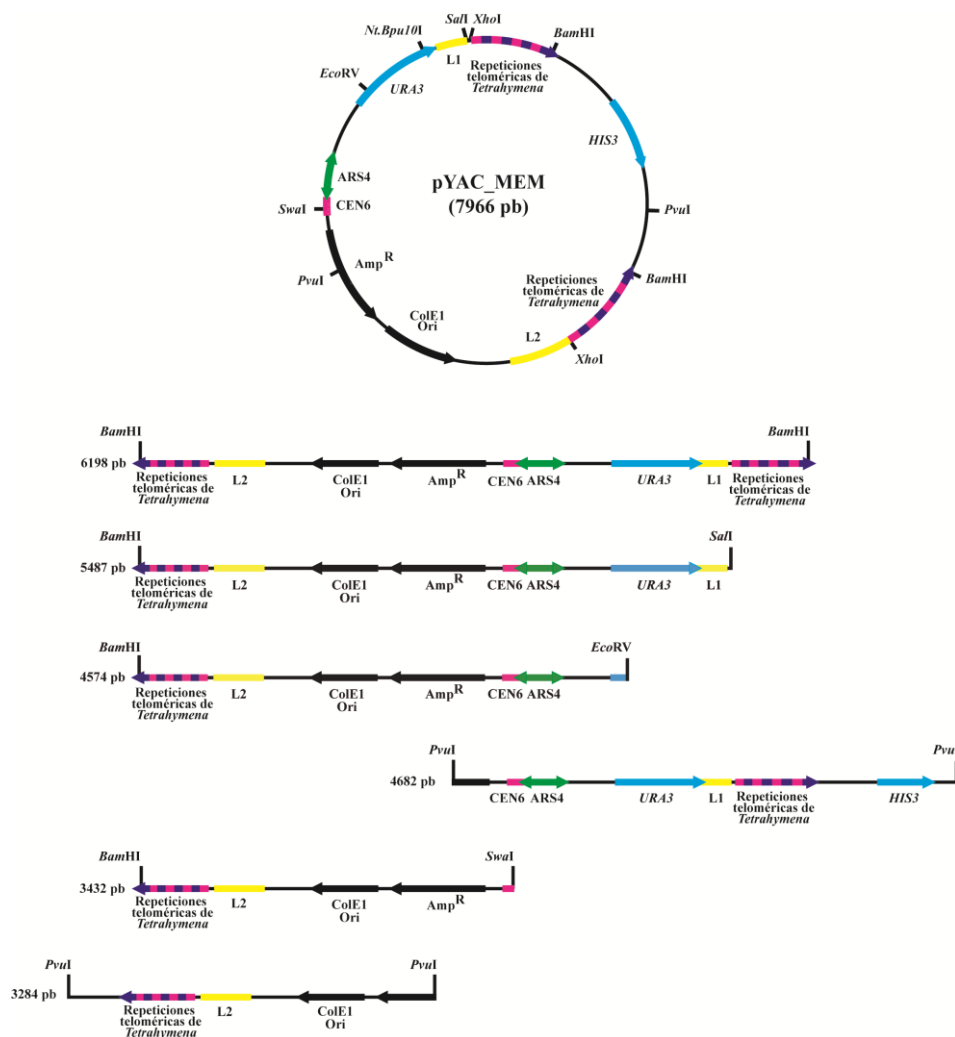


Figura 36. Mapas del minicromosoma pYAC_MEM y de los fragmentos generados tras su digestión con diferentes combinaciones de enzimas de restricción. Nombre, masa e ilustración esquemática de los elementos más relevantes y de los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción de pYAC_MEM y de los diferentes fragmentos generados con las enzimas de restricción que se indican en cada caso.

En todos los casos se asumió que la replicación se inicia de forma bidireccional desde el origen ARS4. En el primer panel obtenido con el programa *2Dgels* de la Figura 37A y siguientes, se asumió que las horquillas se desplazan bidireccionalmente y a la misma velocidad sin impedimento alguno. Ninguno de los patrones de las inmunodetecciones obtenidas correspondía únicamente a este modelo. El fragmento *BamHI-BamHI*, según el modelo “sin impedimento” (primer panel), debería generar una señal de burbujas que se convierte en Y simple cuando el intermediario alcanza una masa de 1,85x (indicado por la flecha roja), al alcanzar la horquilla que se mueve en el sentido de las agujas del reloj el final del fragmento. El programa predijo que los patrones observados en la inmunodetección correspondían a dos modelos de replicación diferentes

y coexistentes. Según el modelo llamado Cen-P (segundo panel), de centrómero permanente, la iniciación ocurre de manera bidireccional en el ARS. La horquilla que se mueve en sentido contrario a las agujas del reloj, se detiene en el centrómero CEN6 de forma permanente. En este caso, la horquilla que se desplaza en sentido de las agujas del reloj se desplaza por el minicromosoma hasta encontrarse con la horquilla detenida en CEN6. La transición de burbujas a Y dobles tiene lugar cuando el fragmento alcanza una masa 1,44x (indicado por la flecha azul). Esta señal de Y doble parte del arco de Y simple hacia el arco de recombinantes, con una inflexión en forma de gancho, debido a que su masa inicial es de 1,44x. El modelo llamado Cen-T (tercer panel), de centrómero temporal, asume que la horquilla que se desplaza en sentido contrario a las agujas del reloj sufre una parada transitoria cuando alcanza el CEN6 y continúa la replicación después de un período variable de tiempo. Por otro lado, la horquilla que se mueve a favor de las agujas del reloj se desplaza de manera uniforme lo que determina la transición de los intermediarios de burbujas a Y simple con una masa 1,43x (indicado por la flecha roja).

Para confirmar los modelos de replicación llamados Cen-P y Cen-T propuestos por el programa *2Dgels*, estudiamos otros fragmentos con CEN6 y ARS4 en diferentes posiciones relativas. Para el fragmento *BamHI-SalI* (Figura 37B) de 5487 pb hibridado con la sonda L2, ambos modelos asumen que la transición ocurre con una masa de ~1,3x. Para el fragmento *BamHI-EcoRV* (Figura 37 C) de 4574 pb hibridado con L1 la transición ocurre con una masa de ~1,2x. El fragmento *PvuI-PvuI* (Figura 37D) de 4682 pb detectado con la sonda L1, presenta el ARS4 colocado cerca del extremo izquierdo del fragmento y ambos modelos predicen una señal de burbujas hasta una masa de 1,9x.

Analizando de nuevo la Figura 36, los fragmentos sin el ARS4 permiten el estudio de la progresión y terminación de las horquillas de replicación. Para el fragmento *BamHI-SwaI* (Figura 37E) de 3242 pb y el fragmento *PvuI-PvuI* (Figura 37F) de 3284 pb los modelos predicen que la mayoría de los RIs consisten en una Y simple. El modelo Cen-T, asume que el bloqueo parcial en CEN6 sufrido por la horquilla que se desplaza en sentido contrario a las agujas del reloj permite la entrada de la otra horquilla en el fragmento en estudio por lo que la terminación tiene lugar en diferentes posiciones relativas cerca del extremo izquierdo. Las señales generadas por infrecuentes y diferentes patrones de Y dobles generan un *smear* triangular (Martin-Parras et al., 1991; Santamaria et al., 2000a).

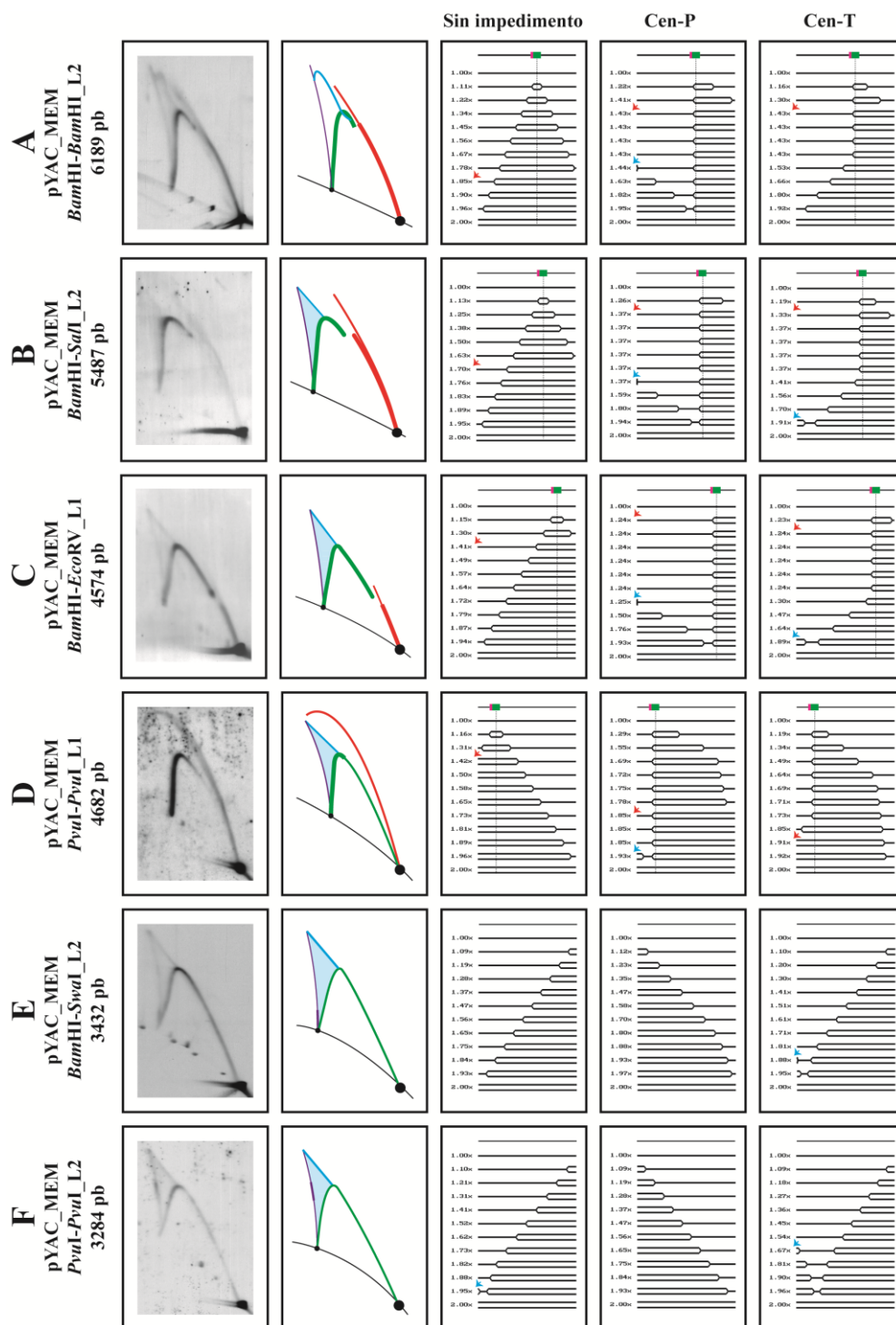


Figura 37. Análisis de los RIs de pYAC_MEM digeridos con diferentes combinaciones de enzimas mediante geles bidimensionales. Células top2-td transformadas con pYAC_MEM y sincronizadas en G1 se recogieron a los 40 minutos y se aislaron las formas replicativas. El DNA se digirió con distintas enzimas y se analizó por electroforesis bidimensional. En los paneles de la izquierda se muestran las inmunodetecciones de los RIs indicando las enzimas empleadas, el tamaño del fragmento y la sonda utilizada para la hibridación. A su derecha se muestran los respectivos esquemas interpretativos: en color rojo se representa el arco de burbujas, en verde el arco de Y simples, en azul el arco de Y dobles, en morado el arco de recombinantes y en negro el arco de lineales. En los paneles siguientes se muestran los RIs simulados con el programa *2DGels* con sus respectivas masas indicadas a la izquierda de cada RI; en la parte superior se muestra un mapa del fragmento en estudio con el origen de replicación bidireccional en color verde y el centrómero en magenta.

4.3.4.2. Análisis de los RIs de YAC_MEM

Con el fin de identificar diferencias en la replicación de las formas circular y lineal del minicromosoma, se analizaron los RIs de YAC_MEM (Figura 38) para compararlos con los obtenidos de pYAC_MEM digerido con *Bam*HI de la Figura 37A ya que contienen los mismos elementos y casi idéntico tamaño. La diferencia de tamaño es debida a que en el minicromosoma lineal YAC_MEM la telomerasa de levaduras añade secuencias teloméricas propias, aumentando ligeramente el tamaño del minicromosoma (Shampay et al., 1984).

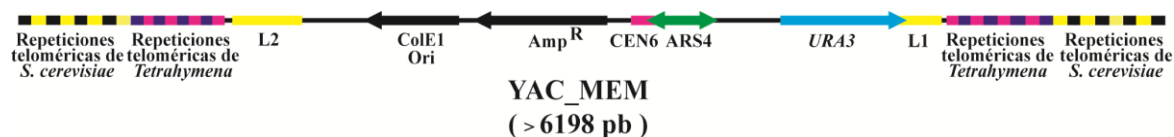


Figura 38. Mapa del minicromosoma YAC_MEM en *S. cerevisiae*. Nombre, masa e ilustración esquemática de los elementos más relevantes.

La inmunodetección de YAC_MEM aislado de células que han crecido en condiciones permisivas y la inmunodetección del mismo aislado de células que han crecido en condiciones restrictivas se muestran en la Figura 39A y B, respectivamente. Ambas inmunodetecciones se acompañan de un diagrama interpretativo. En los dos casos, con y sin Topo 2, los patrones de replicación fueron idénticos: un arco de burbujas casi completo y un arco de Y simple completo. La detección de un arco de burbujas prácticamente completo indica una iniciación de la replicación en el elemento ARS4 tal como aparece simulado en el primer panel. Por otra parte, la detección de un arco de Y simples completo indica la iniciación de la replicación en uno de los telómeros lo que determinaría una replicación unidireccional desde un extremo al otro del cromosoma lineal (segundo panel). Se observa que la señal del arco de Y simples es más intensa hacia el final de la replicación, conforme la masa de los RIs se acerca a 2,0x. Esto puede explicarse por la yuxtaposición de ambos patrones en esa región, como predice el programa de simulación *2Dgels*, ya que la transición de burbuja a Y simple ocurre en una masa de 1,85x.

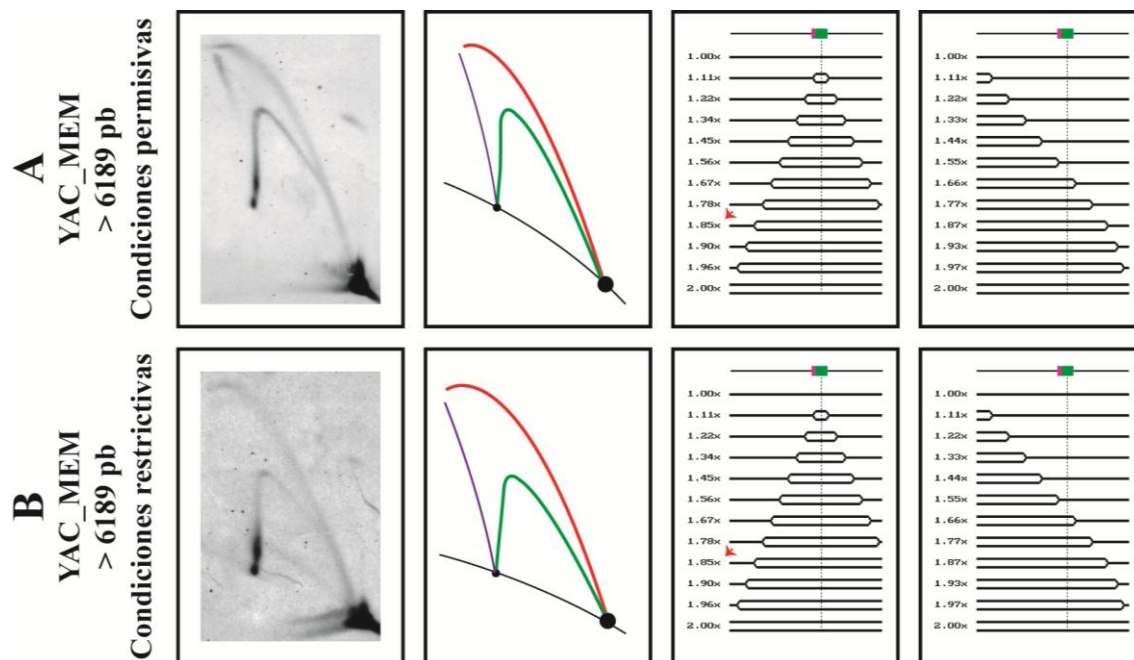


Figura 39. Análisis mediante geles bidimensionales de los RIs de YAC_MEM aislados de células top2-td de *S. cerevisiae* en presencia y ausencia de Topo 2. Células top2-td transformadas con YAC_MEM crecidas en presencia (A) y ausencia (B) de Topo 2 y sincronizadas en G1 se recogieron a los 40 minutos tras la liberación en fase S y se aislaron las formas replicativas. El DNA intacto se analizó por electroforesis bidimensional. En los paneles de la izquierda se muestran las inmunodetecciones de los RIs detectados con la sonda L2. A su derecha se muestran sus respectivos esquemas interpretativos: en color rojo se representa el arco de burbujas, en verde el arco de Y simples, en morado el arco de recombinantes y en negro el arco de lineales. En los paneles siguientes se muestran los RIs simulados con el programa *2DGels* con sus respectivas masas indicadas a la izquierda de cada RI; en la parte superior se muestra un mapa del fragmento en estudio con el origen de replicación bidireccional en color verde y el centrómero en magenta.

4.3.5. Análisis de los productos de segregación de pYAC_MEM y YAC_MEM

Con el objeto de analizar cómo ocurre la segregación de los minicromosomas y en base a los perfiles obtenidos por citometría de flujo de la Figura 34, las células se recogieron en el minuto 80 después de la liberación en la fase S. Se aisló el DNA y se analizaron, mediante electroforesis bidimensional, tanto las formas intactas como las digeridas con una enzima de restricción de cadena sencilla.

4.3.5.1. Análisis de los productos de segregación de pYAC_MEM

En la Figura 40 se muestran las inmunodetecciones de las formas intactas de pYAC_MEM aisladas en el minuto 80 y detectadas utilizando la sonda L2. En condiciones permisivas (Figura 40A) se observan los topoisómeros de las formas

monoméricas y diméricas, lo que indica que la Topo 2 desencadena eficientemente las cromátidas hermanas una vez la replicación ha tenido lugar. Por el contrario, en condiciones restrictivas (Figura 40B), además de formas monoméricas, se detectan las distintas especies de moléculas encadenadas (CatAs, CatBs y CatCs) lo cual indica que la Topo 2 no está llevando a cabo su función.

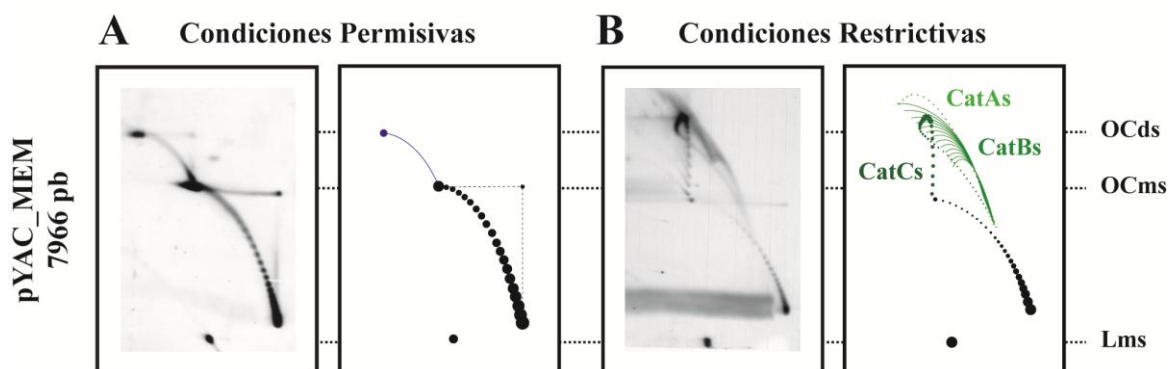


Figura 40. Análisis mediante geles bidimensionales de los RIs de pYAC_MEM aislados de células top2-td de *S. cerevisiae* en presencia y ausencia de Topo 2. Células top2-td transformadas con pYAC_MEM crecidas en presencia (A) y ausencia (B) de Topo 2 y sincronizadas en G1 se recogieron a los 80 minutos tras la liberación en fase S y se aislaron las formas replicativas. En los paneles de la izquierda se muestran las inmunodetecciones de los RIs detectados con la sonda L2. A su derecha se muestran sus respectivos esquemas interpretativos.

Para confirmar la naturaleza de las distintas formas topológicas observadas en la Figura 40, las muestras intactas de pYAC_MEM se trataron con la endonucleasa de restricción de cadena sencilla *Nt.Bpu10I*, y posteriormente se analizaron por electroforesis bidimensional. En presencia de Topo 2 (Figura 41A) se detectan, únicamente, OCms y OCds mientras que, en ausencia de Topo 2 (Figura 41B) las señales más evidentes son las correspondientes a CatAs. En ambos casos, la desaparición de la señal correspondiente a las formas CCCs sirve como control interno de la completa digestión de *Nt.Bpu10I*.

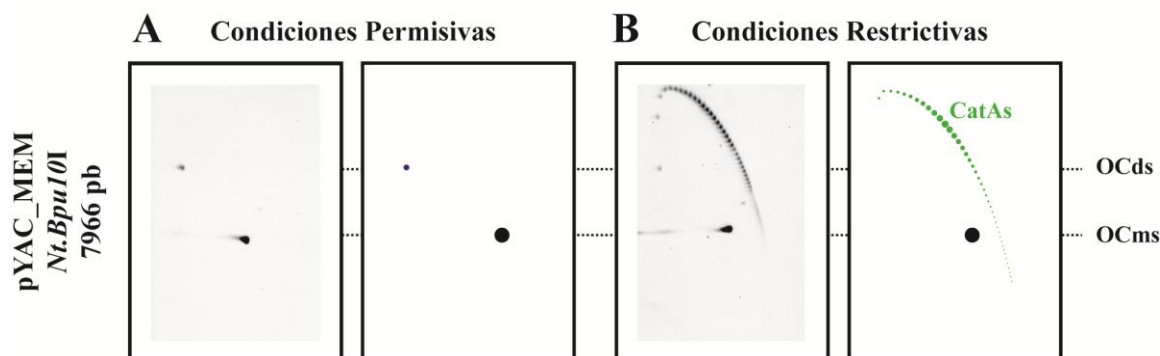


Figura 41. Análisis mediante geles bidimensionales de los RIs de pYAC_MEM aislados de células top2-td de *S. cerevisiae* en presencia y ausencia de Topo 2 y tratados con *Nt.Bpu10I*. Células top2-td transformadas con pYAC_MEM crecidas en presencia (A) y ausencia (B) de Topo 2 y sincronizadas en G1 se recogieron a los 80 minutos de la liberación en fase S, se aislaron las formas replicativas y se trató con la endonucleasa de restricción de cadena sencilla *Nt.Bpu10I*. En los paneles de la izquierda se muestran las inmunodetecciones de los RIs detectados con la sonda L2. A su derecha se muestran sus respectivos esquemas interpretativos.

4.3.5.2. Análisis de los productos de segregación de YAC_MEM

En la Figura 42 se muestran las inmunodetecciones de las formas intactas de YAC_MEM aisladas en el minuto 80 y detectadas utilizando la sonda L2. La única señal detectada corresponde a monómeros lineales, independientemente de la presencia o ausencia de Topo 2. Puesto que en el minuto 40 se observan RIs en ambos casos (Figura 39), este resultado indica que los minicromosomas lineales son capaces de segregar tanto en presencia como en ausencia de Topo 2.

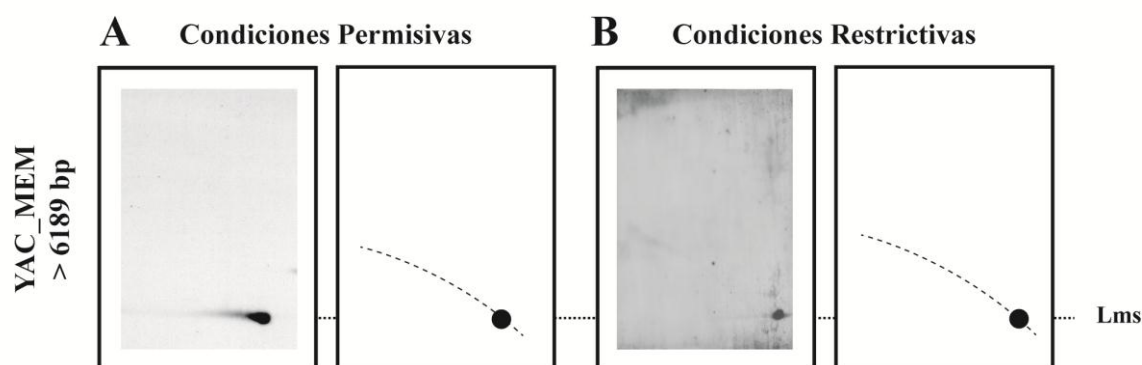


Figura 42. Análisis mediante geles bidimensionales de los productos de segregación de YAC_MEM. Inmunodetecciones correspondientes a la electroforesis bidimensional del DNA aislado de células top2-td transformadas con YAC_MEM y sincronizadas en el minuto 80 tras la liberación en fase S en presencia (A) y ausencia (B) de Topo 2.

4.3.6. Construcción de minicromosomas artificiales circulares y lineales con una barrera para las horquillas de replicación (RFB) y análisis de sus RIs

Para estudiar si, además del centrómero, otras barreras naturales también dependen del superenrollamiento, se clonó un fragmento conteniendo la barrera de la horquilla de replicación (RFB) del DNA ribosómico de levaduras en su orientación activa (Brewer and Fangman, 1988). La secuencia RFB se localiza en el espacio intergénico y a ésta se une la proteína FOB1; este complejo detiene las horquillas de replicación de manera polar (Kobayashi, 2003; Kobayashi and Horiuchi, 1996).

La construcción del minicromosoma se realizó como se detalla en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos. El minicromosoma circular pYAC_MEM_RFB+ de 8908 pb se digirió con la enzima *Bam*HI para dar lugar a la forma lineal YAC_MEM_RFB+ de 7140 pb. Los mapas de los dos minicromosomas con sus elementos más relevantes se muestran en la Figura 43A y B. Las células top2-td de *S. cerevisiae* transformadas con ambos minicromosomas se bloquearon con α -factor en G1 y se liberaron de forma sincrónica en la fase S en condiciones permisivas. Las células se recogieron 40 minutos después de la liberación, se aisló el DNA y los RIs se analizaron por electroforesis bidimensional. Las inmunodetecciones obtenidas se muestran en la columna de la izquierda de la Figura 43C con sus correspondientes diagramas interpretativos a su derecha. El programa de simulación *2DGels* se utilizó para predecir la forma de los RIs obtenidos y los paneles de los modelos obtenidos se muestra a la derecha de los diagramas interpretativos de las inmunodetecciones.

El DNA aislado de pYAC_MEM_RFB+ se digirió con las enzimas *Bam*HI y *Swa*I dando lugar a un fragmento de 3708 pb (Figura 43B). La inmunodetección obtenida del gel bidimensional de este fragmento se muestra en la Figura 43C. Se observan un arco de burbujas completo y un arco de Y simples también completo con dos acumulaciones sobre éste último. Estos patrones son explicables según tres posibles modelos generados por el programa *2DGels*: 1) la replicación se inicia en el ARS4 de forma bidireccional y las horquillas avanzan sin impedimento, 2) la replicación comienza en el ARS4 y la horquilla que viaja en sentido contrario a las agujas del reloj se detiene permanentemente en CEN6 mientras que la otra horquilla avanza sin impedimento a través de la RFB, 3) la

replicación comienza en el ARS4 y la horquilla que se mueve en sentido contrario de las agujas del reloj permanece detenida transitoriamente en CEN6 mientras que la otra horquilla se detiene permanentemente en el primer o segundo sitio de la RFB.

El DNA aislado de YAC_MEM_RFB+ se analizó, en este caso, sin digerir, por lo que su tamaño era de aproximadamente 7140 pb (Figura 43B). En la inmunodetección correspondiente de la Figura 43C se observa un arco de burbujas completo y un arco de Y simples también completo con una acumulación sobre el mismo. Estos patrones son explicables según tres modelos generados por el programa *2DGels*: 1) la replicación se inicia en el ARS4 de forma bidireccional y las horquillas avanzan sin impedimento, 2) la replicación empieza en el ARS4 y la horquilla que viaja en el sentido de las agujas del reloj se detiene permanentemente en la RFB, 3) la replicación comienza en el telómero y la horquilla que se mueve a la derecha se detiene permanentemente en la RFB.

Los resultados obtenidos demostraron que la RFB funciona en ambos minicromosomas, es decir, actúa como barrera independientemente de la topología del DNA.

4.3.7. Estudio de la transcripción del gen *URA3* en pYAC_MEM y YAC_MEM

Una observación directa de la transformación de las células top2-td de *S. cerevisiae* con los minicromosomas pYAC_MEM, YAC_MEM y sus variantes con RFB es que dichas células no pueden sobrevivir a menos que el gen *URA3* de los minicromosomas transcriba de forma operativa. Beaurepaire y Chaconas han estudiado la expresión de varios genes presentes en los plásmidos circulares y lineales del genoma de *Borrelia burgdorferi* y han visto que la misma depende del contexto topológico en el que se encuentran (Beaurepaire and Chaconas, 2007). Por ello, decidimos analizar si en nuestro modelo de minicromosoma circular y lineal existen diferencias en la transcripción del gen *URA3*.

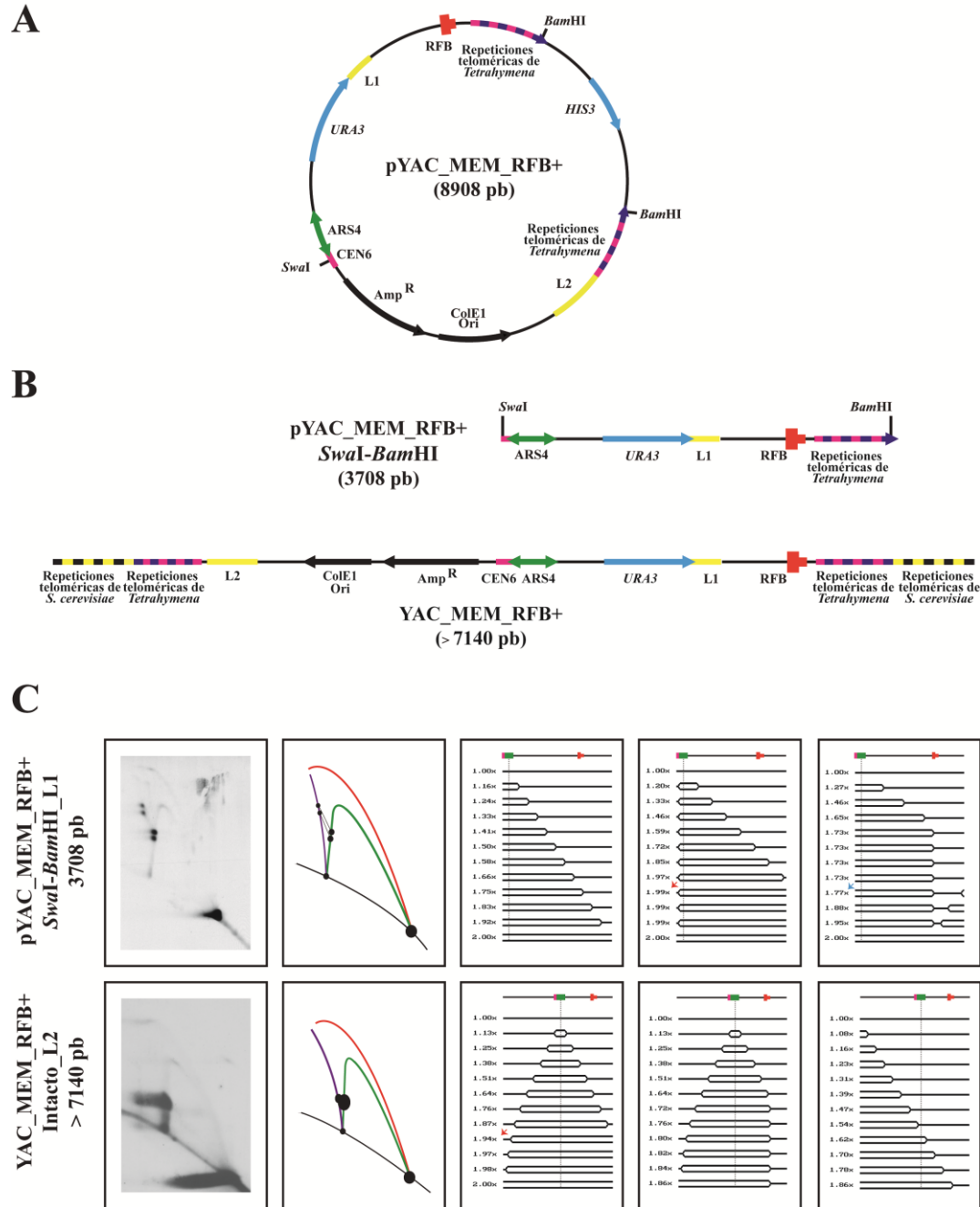


Figura 43. Mapas de los minicromosomas pYAC_MEM_RFB+ y YAC_MEM_RFB+ y análisis mediante geles bidimensionales de los RIs de los dos fragmentos estudiados. A: Nombre, masa e ilustración esquemática de los elementos más relevantes y de los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción de pYAC_MEM_RFB+. **B:** Nombre, masa e ilustración esquemática de los elementos más relevantes del fragmento pYAC_MEM_RFB+ digerido con *SwaI* y *BamHI* y de YAC_MEM_RFB+. **C:** Células top2-td transformadas con pYAC_MEM y sincronizadas en G1 se recogieron a los 40 minutos y se aislaron las formas replicativas. El DNA se digirió con distintas enzimas y se analizó por electroforesis bidimensional. En los paneles de la izquierda se muestran las inmunodetecciones de los RIs indicando las enzimas empleadas, el tamaño del fragmento y la sonda utilizada para la hibridación. A su derecha se muestran sus respectivos esquemas interpretativos: en color rojo se representa el arco de burbujas, en verde el arco de Y simples, en morado el arco de recombinantes y en negro el arco de lineales. En los paneles siguientes se muestran los RIs simulados con el programa *2DGels* con sus respectivas masas indicadas a la izquierda de cada RI y en la parte superior se muestra un mapa del fragmento en estudio con el origen de replicación bidireccional en color verde, el centrómero en magenta y la barrera para la horquilla de replicación en rojo.

Para medir el nivel de expresión del gen *URA3* se llevó a cabo una retrotranscripción del RNA de ambos minicromosomas seguida de PCR cuantitativa (RT-qPCR). Se partió de dos cultivos independientes de células top2-td transformadas con pYAC_MEM o YAC_MEM creciendo en condiciones permisivas. Como control se utilizó un cultivo de células top2-td sin transformar. En la Figura 44A se muestran los resultados de las RT-qPCR. Se observó que el gen *URA3* se expresa 2,2 veces más en el minicromosoma circular que en el lineal. Hay que recordar que el número de copias de ambos minicromosomas es diferente (apartado 4.3.3), habiendo más copias por célula del minicromosoma YAC_MEM (3,1) que del pYACMEM (1,4). Teniendo en cuenta este hecho se combinaron los datos para calcular la transcripción relativa de *URA3* por copia del gen. De esta forma, el nivel de expresión en pYAC_MEM es 4,8 veces mayor que en YAC_MEM (Figura 44B). Los niveles de transcripción relativos mostrados en la Figura 44A se calcularon usando la ecuación Pfaffl (Pfaffl, 2001) y el análisis estadístico se realizó con el programa de randomización de datos REST® el cual originó un p valor de 0,002 indicando que existían diferencias significativas entre las 7 muestras analizadas.

Los resultados indican que el gen *URA3* presenta un mayor nivel de transcripción cuando se encuentra superenrollado.

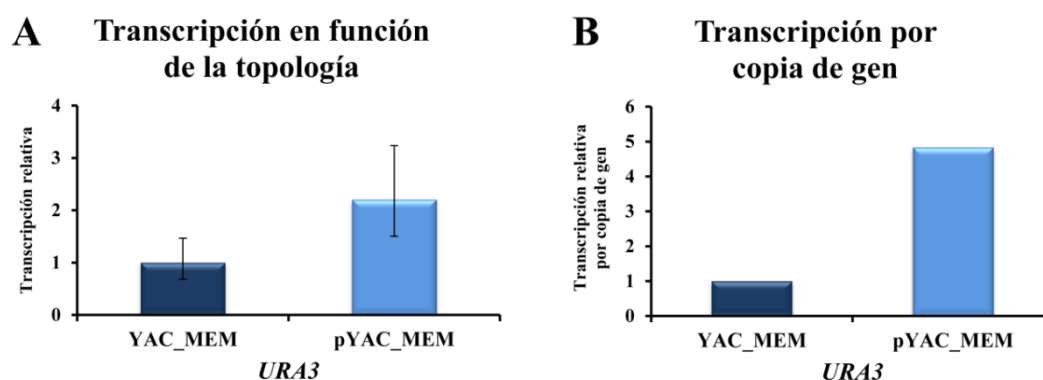


Figura 44. Niveles relativos de transcripción del gen *URA3* en pYAC_MEM y YAC_MEM. Células top2-td de *S. cerevisiae* en crecimiento asincrónico, en condiciones permisivas y transformadas con los minicromosomas pYACMEM o YACMEM se recogieron para su posterior extracción de RNA y posterior análisis mediante RT-qPCR. Se utilizó actina como gen endógeno de referencia. **A:** Diferencia relativa del nivel de transcripción del gen *URA3* entre pYAC_MEM y YAC_MEM. El nivel de transcripción del gen *URA3* en YAC_MEM se definió como 1. El nivel de transcripción relativa del gen *URA3* en pYAC_MEM se obtuvo de 7 experimentos diferentes y se calculó con la ecuación Pfaffl (Pfaffl, 2001). Las barras indican la desviación estándar en cada caso. El análisis estadístico se realizó con el programa REST® (Pfaffl et al., 2002) e indicó un p valor de 0,002. **B:** Diferencia relativa del nivel de transcripción del gen *URA3* entre el pYAC_MEM y YAC_MEM por copia de gen. Se tiene en cuenta los valores del número de copias de minicromosomas presentes por célula calculados en el apartado 4.3.3 de Resultados. El nivel de transcripción del gen *URA3* por copia de gen en YAC_MEM se definió como valor 1.

5. DISCUSIÓN

5.1. Movilidad electroforética de moléculas superenrolladas, encadenadas y anudadas

Bell y Byers utilizaron originalmente la electroforesis bidimensional en geles de agarosa para separar intermediarios de recombinación (RcIs) de moléculas lineales (Ls) (Bell and Byers, 1983). La primera dimensión tuvo lugar a una concentración de 0,7% y un voltaje de 0,75 V/cm mientras que la segunda fue a una concentración de 1,5% de agarosa y 2,0 V/cm. En estas condiciones observaron que los RcIs migraban más lentamente que los Ls de la misma masa y, en condiciones de mayor concentración de agarosa y voltaje aumentaba el retraso en la movilidad. Posteriormente, se advirtió que la movilidad de las moléculas anudadas y encadenadas es proporcional a su compactación cuando se separan en geles de agarosa a bajo voltaje (Crisona et al., 1994; Fitzgerald-Hayes et al., 1982; Laurie et al., 1998; Stasiak et al., 1996; Vologodskii et al., 1998). Aunque el comportamiento de estas moléculas analizado en geles con una elevada concentración de agarosa y alto voltaje ha recibido menor atención, se han podido separar distintas moléculas anudadas con gran resolución (Trigueros et al., 2001). Por otro lado, se sabe que en el caso de RIs anudados hay una inversión en la movilidad electroforética de las burbujas anudadas (Olavarrieta et al., 2002a; Olavarrieta et al., 2002b; Olavarrieta et al., 2002c; Sogo et al., 1999). Para averiguar las razones del cambio en la movilidad de estas moléculas, Webber y colaboradores realizaron simulaciones utilizando el método de Monte Carlo y concluyeron que las moléculas anudadas tendían a quedarse atrapadas entre las fibras del gel (Weber et al., 2013; Weber et al., 2006a; Weber et al., 2006b; Weber et al., 2005). Anteriormente, utilizando el mismo método, se describió que las moléculas de DNA relativamente grandes y superenrolladas adquieren una estructura ramificada que juega un papel importante en su movilidad (Vologodskii and Cozzarelli, 1994).

En esta Tesis Doctoral se ha demostrado que la movilidad electroforética de moléculas superenrolladas, encadenadas y anudadas con la misma masa molecular incrementan su movilidad conforme aumenta su compactación durante la primera dimensión de la electroforesis bidimensional en unas condiciones de concentración de agarosa de 0,4% y un voltaje de 1,0 V/cm (Figuras 20, 21A, 22A, 23, 24A y 25A). Sin embargo, durante la segunda dimensión en condiciones de 0,8-1,2% y 5,0-6,6 V/cm (Figuras 20-25), las moléculas anudadas y encadenadas inicialmente disminuyen su

movilidad electroforética conforme aumenta su complejidad topológica (ΔC). Para comprender estas observaciones hay que tener en cuenta que cuando el tamaño de los poros del gel es más pequeño que las moléculas, la deformación y, por lo tanto, la facilidad de las moléculas para atravesarlos se convierte en el factor limitante de su movilidad (Marko, 1999; Marko and Siggia, 1994; Vetcher et al., 2010; Zivanovic et al., 1986).

En geles de baja concentración de agarosa donde el tamaño del poro es mayor, las moléculas no necesitan comprimirse para pasar a través de ellos. Así, la movilidad electroforética de las moléculas aumenta conforme lo hace la complejidad de los nudos y encadenamientos ya que, a mayor complejidad, mayor compactación. Sin embargo, a alta concentración de agarosa donde el tamaño de los poros del gel es menor, las moléculas de DNA escasamente anudadas o encadenadas tienen mayor dificultad para atravesar el gel que aquellas moléculas del mismo tamaño sin nudos o sin encadenamiento. En este sentido, para que una molécula circular simple como una OC pase a través de un poro estrecho sólo es necesario que dos regiones de la misma se doblen. En cambio, para una molécula encadenada o anudada son necesarias, al menos, cuatro regiones fuertemente plegadas, lo que requiere un mayor trabajo en cada paso a través de un poro y, por tanto, una menor movilidad electroforética. Esto explicaría nuestros resultados de las moléculas anudadas y encadenadas, que inicialmente disminuyen su movilidad electroforética conforme aumenta su complejidad topológica. Por otra parte y como se evidencia en las Figuras 20-25, conforme las moléculas anudadas y encadenadas se vuelven más complejas (más de 8 cruces para moléculas anudadas y más de 6 cruces para moléculas encadenadas) aumenta también su movilidad electroforética, ya que ese grado de encadenamiento y anudamiento causa una fuerte flexión en el DNA facilitando su paso a través del gel.

Nuestros resultados han permitido concluir que para las moléculas circulares de ~ 8000 pb con cruces de superenrollamiento, encadenamiento o anudamiento, la mejor manera de distinguir simultáneamente todos los topoisómeros de estas tres familias, es realizar la primera dimensión en un gel de agarosa al 0,4% y a un voltaje de 1,0 V/cm y la segunda dimensión en un gel al 1,0% a 6,6 V / cm (Figuras 20, 21D y 22D).

5.2. Dinámica de los cambios topológicos durante la replicación de plásmidos bacterianos

Actualmente, existen dos escuelas que intentan aclarar si las horquillas giran o no *in vivo* durante el proceso de replicación (Schvartzman and Stasiak, 2004). Por un lado, se ha descrito que la formación de moléculas encadenadas podría tener lugar casi al final de la replicación, cuando quedaran 200 pb sin replicar y por tanto, ya no podría actuar la DNA girasa ni la Topo IV por delante de la horquilla de replicación ((Hiasa and Marians, 1996; Sundin and Varshavsky, 1980). Por otro lado, se defiende la formación de pre-encadenados a largo de la replicación (Peter et al., 1998; Postow et al., 1999; Schvartzman and Stasiak, 2004). En la presente Tesis se ha tratado de dilucidar si las horquillas de replicación pueden o no girar *in vivo* en plásmidos bacterianos.

Si se considera que la maquinaria de replicación se encuentra anclada a la membrana impidiendo a las horquillas girar *in vivo*, la tensión generada por delante de la horquilla (en la región no replicada) no podría difundir a la región ya replicada. En los plásmidos utilizados en esta Tesis, una vez que la horquilla se detiene en el complejo *Ter*-Tus y, hasta el momento de la extracción del DNA, la DNA girasa seguiría introduciendo superenrollamiento (-) hasta saturar la región no replicada. Al no poder girar las horquillas, este superenrollamiento no difundiría a la región ya replicada en forma de pre-encadenados; la Topo IV no actuaría a este nivel siendo irrelevante si la estirpe es deficiente (*parE10*) o no (*DH5 α F'*) en esta enzima. *In vitro*, durante el proceso de aislamiento y desproteinización del DNA, los cruces dextrógiros del superenrollamiento (-) de la región no replicada podrían difundir a la región ya replicada en forma de pre-encadenados con cruces levógiros hasta que se equilibrara la tensión entre ambas regiones (Figura 2). En los plásmidos pBR-TerE el grado de la torsión variaría dependiendo del tamaño de la región no replicada después de la parada en el sitio *TerE*. Esta región no replicada representa el 20% en el caso de los RIs para pBRTerE@*DraI*, el 40% para pBR-TerE@*AatII* y el 80% para pBR-Ter@*StyI* (Figuras 6, 7 y 8). Cuanto más pequeña sea la región no replicada de los RIs, menos espacio tendría la DNA girasa para introducir superenrollamiento (-). Esta torsión introducida por la DNA girasa se redistribuiría entre la región no replicada y la ya replicada sólo después del proceso de desproteinización. Por

ello, los RIs de pBR-TerE@*StyI* mostrarían el mayor grado de torsión mientras que los de pBR-TerE@*DraI* mostrarían el menor.

En resumen, si las horquillas no giraran *in vivo*, los RIs aislados de la estirpe DH5 α F' estarían igual de torsionados que los aislados de la estirpe deficiente en Topo IV (parE10).

Si se considera que las horquillas pudiesen girar *in vivo*, en el caso de los plásmidos aislados de DH5 α F', a medida que avanza la replicación, el superenrollamiento (+) (con cruces levógiros) que se acumulase inmediatamente por delante de la horquilla podría difundir transitoriamente a la región ya replicada en forma de pre-encadenados (con cruces dextrógiros) para, de esta forma, equilibrar la tensión de la molécula (Champoux and Been, 1980; Peter et al., 1998; Ullsperger et al., 1995). En esta estirpe, la Topo IV podría resolver los pre-encadenados con cruces dextrógiros con menos eficiencia que los levógiros (Crisona et al., 2000). Una vez que la horquilla se detiene en la secuencia *TerE*, los pre-encadenados con cruces dextrógiros de la región replicada y el superenrollamiento (-), también con cruces dextrógiros de la región no replicada se equilibrarían. La DNA girasa continuaría introduciendo superenrollamiento (-) con cruces dextrógiros en la región no replicada y esta torsión difundiría a la región ya replicada como pre-encadenados con cruces levógiros, sustrato preferido de la Topo IV. Este “tira y afloja” entre la DNA girasa y la Topo IV comenzaría en el momento en el que la horquilla se detiene en el complejo *Ter*-Tus y continuaría hasta interrumpirse el crecimiento celular. La eficiencia de la Topo IV retirando pre-encadenados es mayor que la DNA girasa introduciendo superenrollamiento (-) (Hiasa and Mariani, 1996; Ullsperger and Cozzarelli, 1996). En consecuencia, las moléculas parcialmente replicadas aisladas de las células con la Topo IV activa (DH5 α F') no estarían saturadas en ninguna de las dos regiones. En los RIs aislados de la estirpe ParE10 con la Topo IV inactiva cuando la horquilla alcanzara el complejo *Ter*-Tus dejaría de acumularse superenrollamiento (+) por delante de la misma. En la región no replicada, la DNA girasa seguiría introduciendo superenrollamiento (-) con cruces dextrógiros. Si las horquillas giraran *in vivo*, esta torsión difundiría a la región ya replicada como pre-encadenados con cruces levógiros. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurriría en las células DH5 α F', al no poder actuar la Topo IV, estos RIs estarían completamente saturados con pre-encadenamiento en la región

ya replicada y superenrollamiento (-) en la no replicada. Por ello, el nivel de torsión en estos RIs sería mayor que en los aislados de las células DH5 α F'.

En resumen, si las horquillas giraran *in vivo* habría una diferencia en el nivel de torsión de los RIs aislados de ambas estirpes. En la estirpe DH5 α F' la Topo IV podría eliminar pre-encadenados y, por lo tanto, los RIs nunca llegarían a saturarse de superenrollamiento (en la región no replicada) ni de pre-encadenamiento (en la región ya replicada) mientras que, en la estirpe parE10 la Topo IV no podría eliminar el pre-encadenamiento. En la Figura 45 se representan las diferencias en el grado de torsión (superenrollamiento y pre-encadenamiento) esperables en las dos estirpes de *E. coli* para el supuesto de que las horquillas de replicación de plásmidos bacterianos girasen *in vivo*.

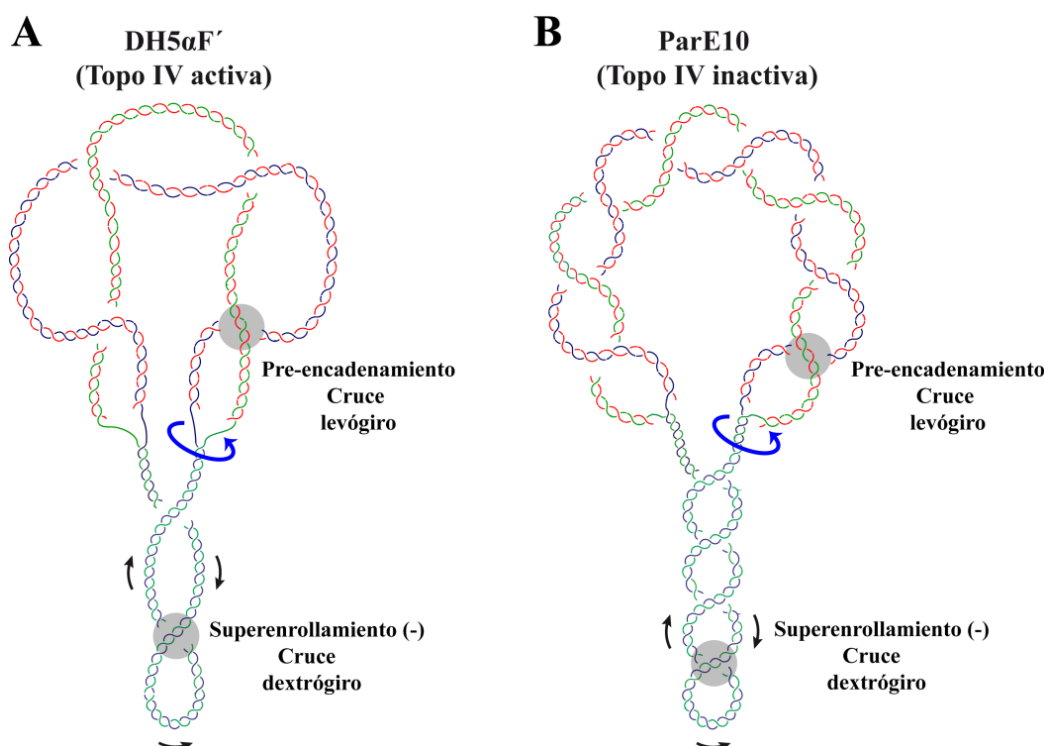


Figura 45. Esquemas de CCRIs ilustrando el grado y distribución de la torsión esperables en sus regiones no replicadas y replicadas una vez aislados si las horquillas pudiesen girar *in vivo*. Para simplificar se representa como CCRI el plásmido pBR-Ter@AatII. **A:** CCRI aislado de células DH5 α F' (Topo IV activa). **B:** CCRI aislado de células parE10 crecidas a temperatura restrictiva (Topo IV inactiva). La flecha azul hace referencia al giro de las horquillas de replicación tanto *in vivo* como *in vitro* (tras la desproteinización) con el consiguiente paso del superenrollamiento de la región no replicada a la ya replicada en forma de pre-encadenamiento. En la región no replicada, las dos hebras parentales se representan en azul y verde. En la región replicada las hebras nacientes se representan en rojo.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral (Figuras 26-29) indican que las horquillas pueden girar *in vivo*.

En los experimentos descritos, utilizamos dos estirpes que se diferencian en tener la Topo IV activa (DH5 α F') o inactiva (parE10) *in vivo*. En los tres plásmidos bacterianos empleados, la horquilla de replicación se detiene en el sitio *TerE* en el 80% de los casos, mientras que en el 20% restante lo atraviesa sin impedimento debido al fallo en la formación de un complejo *Ter*-Tus estable (Olavarrieta et al., 2002c). En estos últimos la replicación se completa normalmente y la segregación tiene lugar siempre que la Topo IV esté activa. En las células parE10, por el contrario, la inhibición de la Topo IV provoca la acumulación de moléculas encadenadas (Adams et al., 1992; Lopez et al., 2012). En las inmunodetecciones de las Figuras 26 y 28 correspondientes a los RIs aislados de DH5 α F' no se observa ningún tipo de molécula encadenada a diferencia de las inmunodetecciones de las Figuras 27 y 29 donde las células parE10 crecieron a la temperatura. Estos resultados sirven como control para confirmar la inhibición de la Topo IV en las células parE10. Por otro lado, descartamos emplear la inhibición de la DNA girasa ya que afectaría a las primeras etapas de la replicación, cuando la actividad de esta enzima resulta crucial, impidiendo la detección de los RIs.

Los plásmidos bacterianos pBR-Ter utilizados nos han permitido disponer de moléculas con distinto grado y tipo de torsión. En los topoisómeros de los RIs del plásmido pBR-TerE@*AatII*, aproximadamente la mitad de la molécula permanece sin replicar mientras que la otra mitad ha sido replicada. Por esta razón, cambios sutiles en su tensión tienen un efecto inmediato en la movilidad electroforética. Comparando la movilidad electroforética de los RIs de los plásmidos con la parada en *AatII* en ambas estirpes (Figuras 26 y 27) observamos que los topoisómeros de los RIs de DH5 α F' describen un arco que abarca desde la zona de mayor movilidad para los RIs de pBR-TerE@*AatII* hasta los OCRIs (Figura 26). En cambio, los topoisómeros aislados de las células parE10 se encuentran acumulados en la zona donde presentan mayor movilidad electroforética, lo que indica que están altamente torsionados (Figura 27). Estas diferencias nos permiten sugerir que las horquillas pueden girar *in vivo*. Sin embargo, esta observación es menos convincente para los plásmidos pBR-TerE@*StyI* y pBR-TerE@*DraI* ya que no hay una diferencia en la distribución ni en la intensidad de las

señales correspondientes a los topoisómeros de los RIs. En el caso de pBR-TerE@*StyI* la mayor parte de la molécula se compone de superenrollamiento en la región no replicada mientras que en pBR-Ter@*DraI* la mayor parte se compone de pre-encadenados en la región ya replicada. Por lo tanto, se necesitarían diferencias muy elevadas de torsión para detectar cambios significativos en la movilidad electroforética de estos plásmidos.

Los resultados obtenidos con el agente intercalante cloroquina (Chl) acenruán la suposición de que las horquillas pueden girar durante la replicación. Si los RIs de los plásmidos aislados de DH5 α F' tuvieran un nivel de torsión menor que los aislados de la estirpe ParE10 se necesitaría menor cantidad del agente intercalante cloroquina (Chl) para alcanzar el mismo nivel de relajación. Se ha descrito que la intercalación de la Chl en las cromátidas hermanas de la región ya replicada no tiene ningún efecto en el superenrollamiento debido a los extremos libres de las cadenas nacientes (Schvartzman and Stasiak, 2004). Por lo tanto, el uso de la Chl sólo tendrá efecto en las regiones no replicadas de los RIs de los plásmidos, induciendo cambios relevantes en el superenrollamiento. En las inmunodetecciones de las Figuras 28 y 29 se observó que en presencia de Chl, en pBR-TerE@*DraI*, como la región no replicada sólo comprende el 20% del plásmido, el efecto es insignificante. En cambio, en pBR-TerE@*StyI*, donde la región no replicada comprende el 80%, quedaron en evidencia las diferencias entre los RIs aislados en ambas estirpes. La Chl relajó completamente un número significativo de CCRIs en el caso de las moléculas aisladas de DH5 α F' (Figura 28) mientras que aún era posible detectar topoisómeros con elevada movilidad electroforética en el caso de los aislados de ParE10 (Figura 29). Una observación similar es evidente en el caso de los plásmidos pBR-TerE@*AatII*.

Los datos experimentales correspondientes a las Figuras 26, 27, 28 y 29 indican que los RIs aislados de células parE10 tienen un nivel de torsión mayor que los aislados de células DH5 α F'. En la Figura 46 se representan los esquemas de los RIs aislados de ambas estirpes según la interpretación basada en los resultados de las Figuras 26-29. Estas diferencias indican que las horquillas de replicación pueden girar *in vivo* y que, por lo tanto, hay formación de pre-encadenados en plásmidos bacterianos durante la replicación.

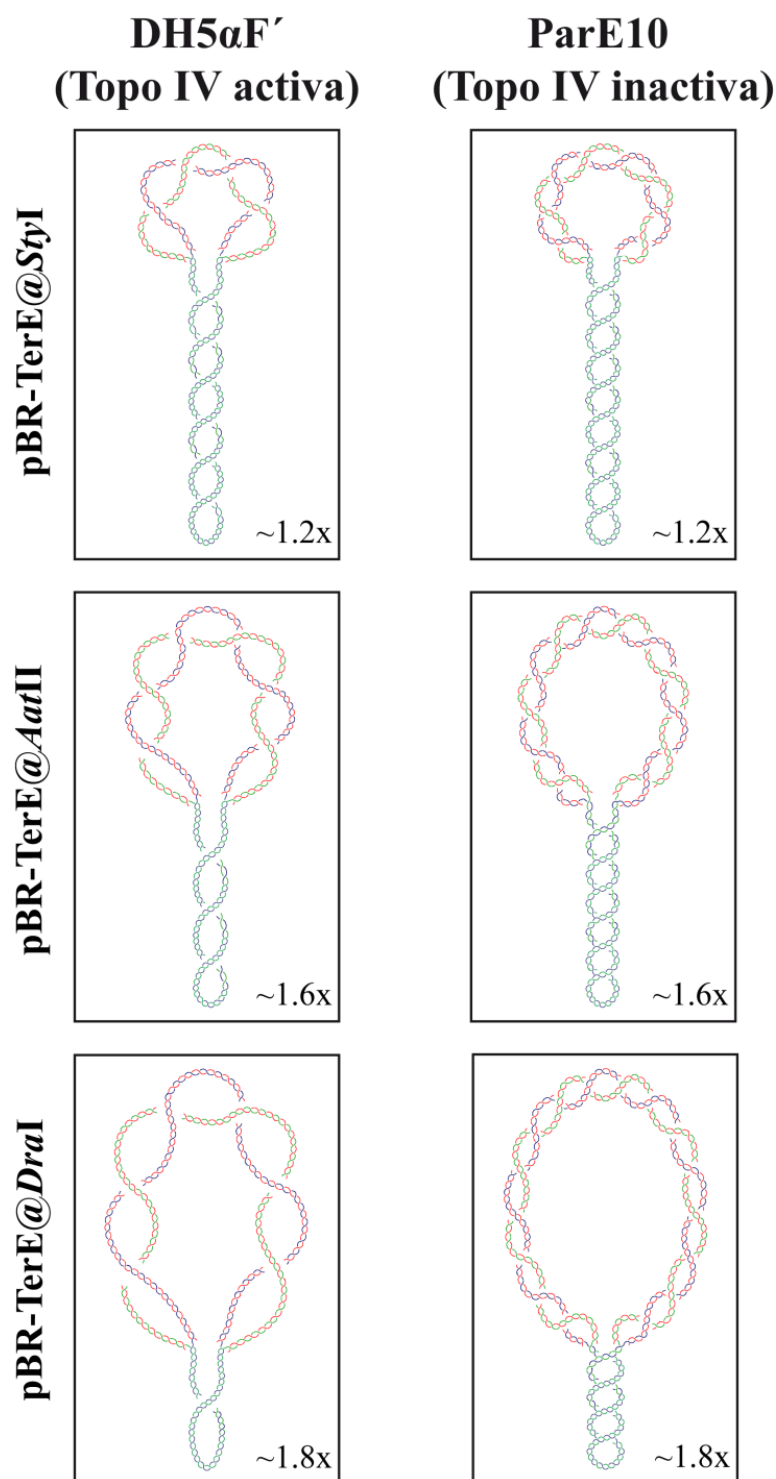


Figura 46. Esquemas ilustrando las diferencias observadas en el grado y distribución de la torsión en las regiones no replicadas y replicadas de los plásmidos pBR-TerE@*StyI*, pBR-TerE@*AatII* y pBR-TerE@*DraI* aislados de células DH5αF' (Topo IV activa) o parE10 en condiciones restrictivas (Topo IV inactiva). Nótese que para el plásmido pBR-TerE@*StyI* la mayoría de los cruces son del tipo de superenrollamiento mientras que para pBR-TerE@*DraI* son del tipo de pre-encadenamiento. En pBR-TerE@*AatII* hay una distribución similar de ambos tipos de torsión. En los tres plásmidos, la torsión general es mayor en los aislados de las células parE10. En todos los casos, las dos hebras parentales se representan en azul y verde mientras que las hebras nacientes se representan en rojo.

5.2.1. Anudamiento de cromátidas hermanas durante la replicación de plásmidos en *E. coli*

En 1987 y 1991, sendos trabajos de Shishido y colaboradores señalaron un aumento de los nudos formados *in vivo* en plásmidos pBR322 crecidos bien en estirpes de *E. coli* defectivas para la DNA girasa o en presencia de inhibidores de dicha enzima, respectivamente (Ishii et al., 1991; Shishido et al., 1987). Los autores atribuyeron entonces a la DNA girasa un posible papel en el anudamiento y desanudamiento del DNA. Sin embargo, posteriormente se describió que la función de desanudar recaía sobre la Topo IV (Adams et al., 1992; Buck and Zechiedrich, 2004; Deibler et al., 2001; Zechiedrich and Cozzarelli, 1995; Zechiedrich et al., 1997). El aumento de nudos observado en el DNA cuando la DNA girasa está inactiva sugiere que el superenrollamiento ayuda a la Topo IV a mantener el DNA desanudado *in vivo* (Lopez et al., 2012; Schvartzman et al., 2013a; Witz et al., 2011a, b; Witz and Stasiak, 2010). Dicho de otro modo, la probabilidad de anudamiento aumenta a medida que disminuye el superenrollamiento. Por otro lado, se ha descrito que el nivel de anudamiento del DNA es proporcional a la masa molecular (Olavarrieta et al., 2002b). Por ello, para analizar diferencias de torsión en los RIs aislados de las estirpes DH5 α F' y parE10, medimos el anudamiento de los RIs en los tres plásmidos de nuestro estudio (Figuras 30-31). Encontramos, en estos casos, que el número y la complejidad de los nudos en los RIs son mayores en los intermediarios aislados de DH5 α F', apuntando que el grado de pre-encadenamiento es mayor para los aislados de parE10.

Las diferencias de torsión observadas en las Figuras 26-31 indican que las horquillas de replicación pueden girar *in vivo* y que, por lo tanto, hay formación de pre-encadenados en plásmidos bacterianos durante la replicación. No obstante, no hay que perder de vista que esta conclusión se basa en observaciones realizadas en plásmidos bacterianos artificiales, de pequeño tamaño y con un bloqueo para la horquilla de replicación; de manera que es posible que el giro sólo se produzca *in vivo* si la progresión de la horquilla está impedida o afectada de alguna manera. La generalización a otros sistemas como el cromosoma de *E. coli* o los cromosomas de los organismos eucariotas entraña una mayor dificultad.

5.3. Replicación, segregación y transcripción de minicromosomas circulares y lineales en *S. cerevisiae*

5.3.1. Papel del superenrollamiento en la progresión de las horquillas de replicación: centrómero y barrera RFB

Las secuencias centroméricas de *S. cerevisiae* constan de 125 pb y están conservadas entre los diferentes cromosomas (Fitzgerald-Hayes et al., 1982). El componente estructural de estas secuencias es un nucleosoma específico en el que la histona 3 centromérica (Cse4p) reemplaza a la histona H3 canónica (Meluh et al., 1998). Estos nucleosomas Cse4p inducen superenrollamiento (+) en minicromosomas de levadura (Furuyama and Henikoff, 2009).

En los distintos patrones obtenidos en el estudio de la replicación del pYAC_MEM (Figura 37), se ha observado un bloqueo de la horquilla de replicación en su encuentro con el centrómero. Dicho bloqueo, temporal o permanente, podría relacionarse con la presencia de superenrollamiento (+) provocado por el nucleosoma, teniendo en cuenta que el superenrollamiento (+) no compensado por delante de la horquilla de replicación obstaculiza el avance de la misma (Greenfeder and Newlon, 1992). En cambio, en el cromosoma lineal YAC_MEM (Figura 38) no se ha observado colapso de la horquilla a la altura del centrómero. Esto podría explicarse por una pérdida de la función del centrómero en el YAC_MEM debido a un antagonismo entre el centrómero y los telómeros (Enomoto et al., 1994). Sin embargo, no explicaría lo observado en pYAC_MEM (Koshland et al., 1987). Por lo tanto, una interpretación alternativa sería la disipación del superenrollamiento por los telómeros en el YAC_MEM evitando el bloqueo en el centrómero.

Se decidió determinar si, además de los centrómeros, hay otras barreras capaces de bloquear las horquillas de replicación dependiendo del nivel de superenrollamiento del DNA. Se estudió, en este caso, la barrera RFB del DNA ribosómico de *S. cerevisiae*, elemento ampliamente estudiado y que funciona en minicromosomas circulares de levaduras de forma natural (Benguria et al., 2003; Brewer and Fangman, 1988; Kobayashi, 2003; Kobayashi and Horiuchi, 1996; Mayan-Santos et al., 2008; Ward et al., 2000). Los

resultados obtenidos demostraron que, tanto en el minicromosoma circular como en el lineal, la RFB actúa como barrera de replicación independientemente de la topología del DNA (Figura 43).

5.3.2. Desplazamiento asimétrico de las horquillas de replicación

En la presente Tesis Doctoral se ha estudiado la replicación de cromosomas artificiales en *S. cerevisiae in vivo* mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa. Los resultados obtenidos indican que la replicación de los minicromosomas circulares se inicia siempre en el ARS (Figura 37). Si la progresión de las dos horquillas de replicación es asimétrica, el encuentro de ambas, que define la terminación de la replicación, no se produciría en la posición diametralmente opuesta al ARS, sino que podría tener lugar a lo largo de una amplia región de terminación del cromosoma. La región de terminación se identifica en los geles bidimensionales como una zona triangular localizada entre el arco de recombinantes, la caída de Y simples y el arco de Y dobles (Schvartzman et al., 2012). En la Figura 37E y F observamos estas zonas triangulares características de una progresión y terminación asimétrica. Además, en la Figura 37A correspondiente al corte con la enzima *Bam*HI, se observa que el tamaño de la burbuja no corresponde al esperado teniendo que el ARS está localizado casi en el centro del fragmento. El arco de burbujas se convierte en un arco de Y simples antes de lo esperado, indicando que una de las horquillas llega al extremo del fragmento antes que la otra. El mismo fenómeno se observa en el corte con *Pvu*I (Figura 37D), confirmando la progresión asimétrica de las horquillas de replicación desde el origen de replicación ARS.

En la gran mayoría de los replicones eucariotas, la activación de un origen de replicación supone el ensamblaje de dos complejos replicativos completos que se mueven en direcciones opuestas (Kornberg and Baker, 1992). En células de mamíferos infectadas con SV40 se observaron, mediante electroforesis bidimensional y microscopía electrónica, horquillas de replicación localizadas en distintos puntos respecto al origen de replicación (Tapper and DePamphilis, 1980). Se concluyó que existían diferencias en las tasas de progresión de las horquillas y que además, se producía una salida asincrónica de las horquillas desde el mismo origen (Tack and Proctor, 1987). Celniker y colaboradores

demonstraron que ciertos plásmidos de *S. cerevisiae* inician la replicación en el ARS1 de manera bidireccional y, al detectar moléculas asimétricas en las etapas tempranas de la replicación, sugirieron que las horquillas raramente se disparan al mismo tiempo (Celniker et al., 1984). En nuestro laboratorio, Santamaría y colaboradores detectaron una heterogeneidad en la población de RIs en plásmidos de replicación autónoma *in vivo* en *S. cerevisiae*. Se propuso entonces, que la terminación de la replicación de forma aleatoria es debida a la salida asincrónica de las dos horquillas desde un mismo origen bidireccional pero con diferencias en la tasa de progresión de las mismas (Santamaria et al., 2000b). Por otro lado, los procesos de replicación y transcripción simultáneos en una misma molécula de DNA producen una colisión de ambas maquinarias (Deshpande and Newlon, 1996; McGlynn et al., 2012). El resultado de esta colisión depende de la orientación de la unidad de transcripción con respecto a la horquilla de replicación siendo las colisiones cabeza con cabeza más problemáticas que las codireccionales (Prado and Aguilera, 2005; Srivatsan et al., 2010; Wang et al., 2007). Además, tanto la transcripción como la replicación generan superenrollamiento (+) por delante de las horquillas, lo que puede producir un bloqueo topológico para el avance de las mismas (Olavarrieta et al., 2002a; Wu et al., 1988).

Los resultados de la Figura 37 indican la convergencia de varios fenómenos durante la replicación del minicromosoma pYAC_MEM. Por un lado, el bloqueo temporal o permanente, comentado en el apartado anterior y simulado por el programa *2Dgels*. Por otro lado, la progresión asimétrica intrínseca de las horquillas de replicación descrita en plásmidos de *S. cerevisiae* (Celniker et al., 1984; Santamaria et al., 2000b). Además, la progresión (y consecuente terminación) asimétrica que se detecta, podría deberse a una ralentización de la horquilla que recorre la zona del gen *HIS3* debida a una eventual colisión entre las maquinarias de replicación y transcripción (Olavarrieta et al., 2002a; Prado and Aguilera, 2005).

5.3.3. Iniciación de la replicación en los telómeros

En células humanas y de levaduras existen evidencias de que las horquillas de replicación se detienen al llegar al DNA telomérico indicando que estas zonas replican de manera distinta y más lenta (Makovets et al., 2004; Miller et al., 2006). Se ha postulado que los orígenes que replican el DNA telomérico se localizan normalmente en la región subtelomérica y no dentro de las secuencias teloméricas (Gilbert, 2004; Gilson and Geli, 2007). Sin embargo, Kurth y colaboradores establecieron un modelo con substratos lineales de DNA compuestos exclusivamente por repeticiones teloméricas que eran capaces de iniciar la replicación en extractos de *Xenopus*, sugiriendo que los orígenes activos pueden ensamblarse y activarse en estas zonas (Kurth and Gautier, 2010). En fibroblastos de embriones de ratón se ha visto que un 3% de la replicación inicia dentro de los telómeros (Sfeir et al., 2009). Asimismo, se ha observado inicio de la replicación en telómeros de cromosomas humanos en líneas de células madre embrionarias y en dos tipos de células somáticas primarias (Drosopoulos et al., 2012).

El estudio de la replicación del minicromosoma lineal YAC_MEM en *S. cerevisiae* evidenció un doble patrón de replicación (Figura 38). El patrón de burbuja prácticamente completa indica la iniciación de la replicación en el ARS de forma bidireccional. Por otro lado, el patrón de Y simple completa, indica una replicación unidireccional desde uno de los extremos del cromosoma, zona en la que se localizan las repeticiones teloméricas. Esta observación confirma que, al igual que en otros organismos, la iniciación de la replicación puede ocurrir en el DNA telomérico. En el minicromosoma circular pYAC_MEM, por el contrario, la ausencia de un arco de burbujas en el corte *PvuI-PvuI* hibridado con la sonda L2 (Figura 37F) indica que la replicación no se inicia en los telómeros.

5.3.4. Segregación de minicromosomas circulares y lineales en ausencia de Topo 2

El superenrollamiento (-) ayuda a la unión de proteínas requeridas para el comienzo de la replicación y de la transcripción (Gellert, 1981). Conforme progresa la replicación se va acumulando superenrollamiento (+) por delante de las horquillas que debe ser eliminado por las topoisomerasas para mantener el superenrollamiento (-)

necesario para el progreso de la replicación (Peter et al., 1998). Se ha visto que la progresión de la replicación no está afectada por la delección independiente de la Topo 1 ó 2 (Bermejo et al., 2007). Sin embargo, una vez que la replicación llega a su fin, la Topo 2 es la encargada de eliminar los encadenados resultantes, permitiendo la segregación de las cromátidas hermanas (Holm et al., 1985). La Topo 3 junto con la helicasa Sgs1 es capaz de desencadenar DNA *in vitro* (Cejka et al., 2012). En esta Tesis (Figuras 40 y 41) se ha confirmado que en ausencia de Topo 2 *in vivo* se acumulan encadenados de minicromosomas circulares, incapaces de segregar una vez terminada la replicación (Baxter et al., 2011; Brill et al., 1987). En cuanto a la segregación del minicromosoma YAC_MEM, vimos que es capaz de segregar en ausencia de Topo 2 (Figura 42).

5.3.5. La tension torsional del cromosoma lineal se disipa por los telómeros permitiendo la segregación en ausencia de Topo 2

En 1992, Gartenberg y Wang observaron que cuando plásmidos circulares de *S. cerevisiae* adquirían un elevado superenrollamiento (+), la transcripción del gen de la β -galactosidasa se veía disminuida (Gartenberg and Wang, 1992). Por otra parte, Roca y colaboradores demostraron que la acumulación de superenrollamiento (+) en el DNA intracelular provoca cambios en los patrones del transcriptoma de *S. cerevisiae*. Estos autores observaron que el nivel de transcripción de diferentes genes está determinado por la distancia que separa a los mismos del final de los cromosomas. Mientras que la mayoría de los genes reducían su nivel de transcripción entre 2 y 6 veces, aquellos localizados a menos de 100 kb del telómero escapaban gradualmente a esta reducción de la transcripción (Joshi et al., 2010). En base a estos resultados, los autores sugirieron que el superenrollamiento se disipa por los telómeros.

Algunos trabajos señalan que las helicasas pif1 y/o rrm3 podrían jugar un papel crucial en la disipación del superenrollamiento a través de los telómeros *in vivo* (Ivessa et al., 2002; Ivessa et al., 2000) y se sigue estudiando la formación de estructuras secundarias en los mismos: *t-loops* (de Lange, 2004) y *G-quartets* (Williamson, 1994). Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral indican que estas estructuras no son barreras topológicas durante la replicación. En las Figuras 39 y 42 se observa que el

minicromosoma lineal YAC_MEM es capaz de replicar y segregar a pesar de la degradación de la Topo 2, confirmando su capacidad de eliminar el superenrollamiento a través de los telómeros. Estos resultados contrastan con los obtenidos con el minicromosoma circular pYAC_MEM (Figuras 40 y 41). En este caso, se trata de un dominio topológicamente cerrado que alberga superenrollamiento y, por lo tanto, en ausencia de Topo 2 no es capaz de completar la segregación.

5.3.6. Transcripción del gen *URA3* en minicromosomas circulares y lineales

La obtención células transformadas con YAC_MEM y YAC_MEM_RFB+ en medio Ura⁻ (Figuras 33 y 43) indica que estos minicromosomas transcriben el gen *URA3* de forma funcional. El superenrollamiento tiene un papel crucial en la transcripción, modulando dicho proceso (Gartenberg and Wang, 1992; Joshi et al., 2010; Liu and Wang, 1987; Ma and Wang, 2014). En el año 2007, Beaurepaire y Chaconas estudiaron varios genes presentes en los plásmidos circulares y lineales del genoma de *Borrelia burgdorferi* y observaron que su transcripción dependía del contexto topológico en el que se encontraban (Beaurepaire and Chaconas, 2007). La utilización de un minicromosoma circular frente a uno lineal, nos ha permitido estudiar la transcripción del gen *URA3*, presente en ambos contextos. Los resultados conseguidos indican que el nivel de expresión relativa del gen es 2,2 veces mayor en el contexto circular que en el lineal (Figura 44A). Teniendo en cuenta el número de copias de cada tipo de minicromosoma en las células top2-td (1,4 copias de pYAC_MEM/cél. y 3,1 copias de YAC_MEM/cél. Véase el apartado 4.3.3 de Resultados) la diferencia de expresión puede considerarse hasta 4,8 veces mayor en el minicromosoma circular que en el lineal (Figura 44B). En resumen, podemos concluir que si el gen *URA3*, constitutivamente situado en el cromosoma 3 del genoma de *S. cerevisiae* en un dominio topológico cerrado y por tanto, superenrollado, se transfiere a un dominio sin superenrollamiento como el YAC_MEM, la transcripción es menos eficiente.

5.3.7. Consideraciones acerca de la necesidad de la Topo 2

El origen y la evolución de las topoisomerasas ha sido ampliamente estudiado por el grupo de Forterre (Forterre and Gadelle, 2009; Forterre et al., 2007; Gadelle et al., 2003). El hecho de que las principales familias de topoisomerasas no sean homólogas sugiere que se originaron independientemente en los tres dominios de los seres vivos: Archaea, Bacteria y Eucarya. Por otro lado, parece probable que las topoisomerasas no fueran necesarias para las primeras formas de vida en la tierra como se propone en el modelo del último antepasado común (LUCA: *Last Universal Common Ancestor*) según el cual, el genoma de RNA no necesitaría topoisomerasas (Forterre et al., 2007). Recientemente, se ha descubierto que en bacterias del género *Streptomyces*, la Topo IV es esencial para la segregación de los cromosomas circulares pero no para los lineales (Huang et al., 2013). En esta Tesis se demuestra que la Topo 2 no es necesaria para la replicación y segregación de minicromosomas lineales de levadura. Estas observaciones llevan a plantearse cuestiones como: ¿con qué tamaño se hace necesaria la Topo 2 para segregar? ¿Un cromosoma lineal de levadura con un dominio topológico interno y dos dominios topológicos abiertos en los extremos, se puede considerar un prototipo de cromosoma eucariota? Aunque estas preguntas escapan de los objetivos de esta Tesis, es posible especular con la idea de que en un YAC lineal con dos ARS funcionales, la Topo 2 sería necesaria para resolver la tensión generada por las dos horquillas progresando en direcciones opuestas. Para abordar este desafío, se necesitaría ampliar el tamaño de los minicromosomas de forma gradual, y comprobar progresivamente, la dinámica de la replicación y segregación.

6. CONCLUSIONES

1. La contribución a la movilidad electroforética de un aumento de la complejidad topológica difiere para las moléculas superenrolladas, encadenadas y anudadas, dependiendo de las condiciones de electroforesis.
2. Para moléculas circulares de aproximadamente 8000 pb las mejores condiciones para distinguir todos los topoisómeros de moléculas superenrolladas, encadenadas y anudadas por electroforesis bidimensional en geles de agarosa son una concentración de gel al 0,4% de agarosa y un voltaje de 1,0 V/cm durante la primera dimensión y una concentración de gel al 1,0% de agarosa y un voltaje de 6,6 V/cm durante la segunda dimensión.
3. Los RIs aislados de células de la estirpe DH5 α F' tienen un nivel de torsión menor que los aislados de la estirpe ParE10 lo que sugiere que las horquillas giran *in vivo* durante la replicación dando lugar a la formación de pre-encadenados.
4. La iniciación de la replicación en los minicromosomas circulares sólo tiene lugar en el ARS mientras que en los minicromosomas lineales también puede ocurrir en los telómeros.
5. En los minicromosomas circulares las secuencias centroméricas pueden afectar el progreso de las horquillas de replicación deteniendo su avance de forma temporal o permanentemente. Por el contrario, este avance ocurre sin problemas en minicromosomas lineales.
6. La RFB funciona como barrera de replicación independientemente de la topología del DNA.
7. En ausencia de Topo 2 los minicromosomas lineales son capaces de replicar y segregar. En cambio, los minicromosomas circulares son incapaces de segregar acumulándose en forma de encadenados.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D.E., Shekhtman, E.M., Zechiedrich, E.L., Schmid, M.B., and Cozzarelli, N.R. (1992). The role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. *Cell* 71, 277-288.
- Alexandrov, A.I., Cozzarelli, N.R., Holmes, V.F., Khodursky, A.B., Peter, B.J., Postow, L., Rybenkov, V., and Vologodskii, A.V. (1999). Mechanisms of separation of the complementary strands of DNA during replication. *Genetica* 106, 131-140.
- Bach, T., Krekling, M.A., and Skarstad, K. (2003). Excess SeqA prolongs sequestration of *oriC* and delays nucleoid segregation and cell division. *EMBO J* 22, 315-323.
- Bates, A.D., and Maxwell, A. (1997). DNA topology: topoisomerases keep it simple. *Curr Biol* 7, R778-781.
- Bates, A.D., and Maxwell, A. (2005). DNA topology (Oxford: Oxford University Press).
- Bauer, W., and Vinograd, J. (1968). The interaction of closed circular DNA with intercalative dyes. I. The superhelix density of SV40 DNA in the presence and absence of dye. *J Mol Biol* 33, 141-171.
- Bauer, W.R., Crick, F.H., and White, J.H. (1980). Supercoiled DNA. *Sci Am* 243, 100-113.
- Baxter, J., and Diffley, J.F. (2008). Topoisomerase II inactivation prevents the completion of DNA replication in budding yeast. *Mol Cell* 30, 790-802.
- Baxter, J., Sen, N., Martinez, V.L., De Carandini, M.E., Schwartzman, J.B., Diffley, J.F., and Aragon, L. (2011). Positive supercoiling of mitotic DNA drives decatenation by topoisomerase II in eukaryotes. *Science* 331, 1328-1332.
- Beaurepaire, C., and Chaconas, G. (2007). Topology-dependent transcription in linear and circular plasmids of the segmented genome of *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol* 63, 443-453.
- Bednar, J., Furrer, P., Stasiak, A., Dubochet, J., Egelman, E.H., and Bates, A.D. (1994). The twist, writhe and overall shape of supercoiled DNA change during counterion-induced transition from a loosely to a tightly interwound superhelix. Possible implications for DNA structure in vivo. *J Mol Biol* 235, 825-847.
- Bell, L., and Byers, B. (1983). Separation of branched from linear DNA by two-dimensional gel electrophoresis. *Anal Biochem* 130, 527-535.

- Benguria, A., Hernandez, P., Krimer, D.B., and Schvartzman, J.B. (2003). Sir2p suppresses recombination of replication forks stalled at the replication fork barrier of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 31, 893-898.
- Bermejo, R., Doksani, Y., Capra, T., Katou, Y.M., Tanaka, H., Shirahige, K., and Foiani, M. (2007). Top1- and Top2-mediated topological transitions at replication forks ensure fork progression and stability and prevent DNA damage checkpoint activation. *Genes Dev* 21, 1921-1936.
- Bliska, J.B., and Cozzarelli, N.R. (1987). Use of site-specific recombination as a probe of DNA structure and metabolism in vivo. *J Mol Biol* 194, 205-218.
- Boles, T.C., White, J.H., and Cozzarelli, N.R. (1990). Structure of plectonemically supercoiled DNA. *J Mol Biol* 213, 931-951.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H., and Falkow, S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2, 95-113.
- Breeden, L.L. (1997). Alpha-factor synchronization of budding yeast. *Methods Enzymol* 283, 332-341.
- Brewer, B.J., and Fangman, W.L. (1987). The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*. *Cell* 51, 463-471.
- Brewer, B.J., and Fangman, W.L. (1988). A replication fork barrier at the 3' end of yeast ribosomal RNA genes. *Cell* 55, 637-643.
- Brewer, B.J., Lockshon, D., and Fangman, W.L. (1992). The arrest of replication forks in the rDNA of yeast occurs independently of transcription. *Cell* 71, 267-276.
- Brill, S.J., DiNardo, S., Voelkel-Meiman, K., and Sternglanz, R. (1987). Need for DNA topoisomerase activity as a swivel for DNA replication for transcription of ribosomal RNA. *Nature* 326, 414-416.
- Brill, S.J., and Sternglanz, R. (1988). Transcription-dependent DNA supercoiling in yeast DNA topoisomerase mutants. *Cell* 54, 403-411.
- Brown, P.O., and Cozzarelli, N.R. (1979). A sign inversion mechanism for enzymatic supercoiling of DNA. *Science* 206, 1081-1083.

- Brown, P.O., and Cozzarelli, N.R. (1981). Catenation and knotting of duplex DNA by type 1 topoisomerases: a mechanistic parallel with type 2 topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 843-847.
- Buck, G.R., and Zechiedrich, E.L. (2004). DNA disentangling by type-2 topoisomerases. *J Mol Biol* 340, 933-939.
- Cairns, J. (1963). The bacterial chromosome and its manner of replication as seen by autoradiography. *J Mol Biol* 6, 208-213.
- Cejka, P., Plank, J.L., Dombrowski, C.C., and Kowalczykowski, S.C. (2012). Decatenation of DNA by the *S. cerevisiae* Sgs1-Top3-Rmi1 and RPA complex: a mechanism for disentangling chromosomes. *Mol Cell* 47, 886-896.
- Celniker, S.E., Sweder, K., Srienc, F., Bailey, J.E., and Campbell, J.L. (1984). Deletion mutations affecting autonomously replicating sequence ARS1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 4, 2455-2466.
- Clayton, D.A., and Vinograd, J. (1967). Circular dimer and catenate forms of mitochondrial DNA in human leukaemic leucocytes. *Nature* 216, 652-657.
- Cozzarelli, N.R. (1980). DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science* 207, 953-960.
- Crisona, N.J., Kanaar, R., Gonzalez, T.N., Zechiedrich, E.L., Klippel, A., and Cozzarelli, N.R. (1994). Processive recombination by wild-type gin and an enhancer-independent mutant. Insight into the mechanisms of recombination selectivity and strand exchange. *J Mol Biol* 243, 437-457.
- Crisona, N.J., Strick, T.R., Bensimon, D., Croquette, V., and Cozzarelli, N.R. (2000). Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by *E. coli* topoisomerase IV in single-molecule and ensemble measurements. *Genes Dev* 14, 2881-2892.
- Champoux, J.J. (2001). DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* 70, 369-413.
- Champoux, J.J., and Been, M.D. (1980). Topoisomerases and the swivel problem. In *Mechanistic studies of DNA replication and genetic recombination ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology*, B. Alberts, ed. (Academic Press, New York), pp. 809-815.
- Charvin, G., Bensimon, D., and Croquette, V. (2003). Single-molecule study of DNA unlinking by eukaryotic and prokaryotic type-II topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9820-9825.

Chen, Z., Yang, H., and Pavletich, N.P. (2008). Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures. *Nature* 453, 489-484.

de Lange, T. (2004). T-loops and the origin of telomeres. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 323-329.

Dean, F., Krasnow, M.A., Otter, R., Matzuk, M.M., Spengler, S.J., and Cozzarelli, N.R. (1983). Escherichia coli type-1 topoisomerases: identification, mechanism, and role in recombination. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 47 Pt 2, 769-777.

Dean, F.B., and Cozzarelli, N.R. (1985). Mechanism of strand passage by Escherichia coli topoisomerase I. The role of the required nick in catenation and knotting of duplex DNA. *J Biol Chem* 260, 4984-4994.

Dean, F.B., Stasiak, A., Koller, T., and Cozzarelli, N.R. (1985). Duplex DNA knots produced by Escherichia coli topoisomerase I. Structure and requirements for formation. *J Biol Chem* 260, 4975-4983.

Deibler, R.W., Mann, J.K., Summers de, W.L., and Zechiedrich, L. (2007). Hin-mediated DNA knotting and recombining promote replicon dysfunction and mutation. *BMC Mol Biol* 8, 44.

Deibler, R.W., Rahmati, S., and Zechiedrich, E.L. (2001). Topoisomerase IV, alone, unknots DNA in E. coli. *Genes Dev* 15, 748-761.

Delius, H., and Worcel, A. (1974). Letter: Electron microscopic visualization of the folded chromosome of Escherichia coli. *J Mol Biol* 82, 107-109.

Deshpande, A.M., and Newlon, C.S. (1996). DNA replication fork pause sites dependent on transcription. *Science* 272, 1030-1033.

Di Capua, E., Engel, A., Stasiak, A., and Koller, T. (1982). Characterization of complexes between recA protein and duplex DNA by electron microscopy. *J Mol Biol* 157, 87-103.

Diffley, J.F. (2004). Regulation of early events in chromosome replication. *Curr Biol* 14, R778-786.

DiNardo, S., Voelkel, K., and Sternglanz, R. (1984). DNA topoisomerase II mutant of Saccharomyces cerevisiae: topoisomerase II is required for segregation of daughter molecules at the termination of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 2616-2620.

- DiNardo, S., Voelkel, K.A., Sternglanz, R., Reynolds, A.E., and Wright, A. (1982). *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell* 31, 43-51.
- Dohmen, R.J., Wu, P., and Varshavsky, A. (1994). Heat-inducible degron: a method for constructing temperature-sensitive mutants. *Science* 263, 1273-1276.
- Drlica, K. (1999). Mechanism of fluoroquinolone action. *Curr Opin Microbiol* 2, 504-508.
- Drlica, K., and Malik, M. (2003). Fluoroquinolones: action and resistance. *Curr Top Med Chem* 3, 249-282.
- Drosopoulos, W.C., Kosiyatrakul, S.T., Yan, Z., Calderano, S.G., and Schildkraut, C.L. (2012). Human telomeres replicate using chromosome-specific, rather than universal, replication programs. *J Cell Biol* 197, 253-266.
- Eissenberg, J.C., Cartwright, I.L., Thomas, G.H., and Elgin, S.C. (1985). Selected topics in chromatin structure. *Annu Rev Genet* 19, 485-536.
- Enomoto, S., Longtine, M.S., and Berman, J. (1994). TEL+CEN antagonism on plasmids involves telomere repeat sequences tracts and gene products that interact with chromosomal telomeres. *Chromosoma* 103, 237-250.
- Esposito, F., and Sinden, R.R. (1988). DNA supercoiling and eukaryotic gene expression. *Oxf Surv Eukaryot Genes* 5, 1-50.
- Fernandez, X., Diaz-Ingelmo, O., Martinez-Garcia, B., and Roca, J. (2014). Chromatin regulates DNA torsional energy via topoisomerase II-mediated relaxation of positive supercoils. *EMBO J* 33, 1492-1501.
- Fierro-Fernandez, M., Hernandez, P., Krimer, D.B., and Schwartzman, J.B. (2007a). Replication fork reversal occurs spontaneously after digestion but is constrained in supercoiled domains. *J Biol Chem* 282, 18190-18196.
- Fierro-Fernandez, M., Hernandez, P., Krimer, D.B., Stasiak, A., and Schwartzman, J.B. (2007b). Topological locking restrains replication fork reversal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1500-1505.
- Fitzgerald-Hayes, M., Clarke, L., and Carbon, J. (1982). Nucleotide sequence comparisons and functional analysis of yeast centromere DNAs. *Cell* 29, 235-244.
- Forterre, P., and Gadelle, D. (2009). Phylogenomics of DNA topoisomerases: their origin and putative roles in the emergence of modern organisms. *Nucleic Acids Res* 37, 679-692.

- Forterre, P., Gribaldo, S., Gadelle, D., and Serre, M.C. (2007). Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie* 89, 427-446.
- Freeman, L.A., and Garrard, W.T. (1992). DNA supercoiling in chromatin structure and gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2, 165-209.
- Friedman, K.L., and Brewer, B.J. (1995). Analysis of replication intermediates by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 262, 613-627.
- Froelich-Ammon, S.J., and Osheroff, N. (1995). Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism. *J Biol Chem* 270, 21429-21432.
- Funnell, B.E., Baker, T.A., and Kornberg, A. (1987). In vitro assembly of a prepriming complex at the origin of the Escherichia coli chromosome. *J Biol Chem* 262, 10327-10334.
- Furuyama, T., and Henikoff, S. (2009). Centromeric nucleosomes induce positive DNA supercoils. *Cell* 138, 104-113.
- Gadelle, D., Filee, J., Buhler, C., and Forterre, P. (2003). Phylogenomics of type II DNA topoisomerases. *Bioessays* 25, 232-242.
- Gahn, T.A., and Schildkraut, C.L. (1989). The Epstein-Barr virus origin of plasmid replication, oriP, contains both the initiation and termination sites of DNA replication. *Cell* 58, 527-535.
- Gartenberg, M.R., and Wang, J.C. (1992). Positive supercoiling of DNA greatly diminishes mRNA synthesis in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11461-11465.
- Gellert, M. (1981). DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 50, 879-910.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M.H., and Nash, H.A. (1976). DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 3872-3876.
- Germond, J.E., Hirt, B., Oudet, P., Gross-Bellark, M., and Chambon, P. (1975). Folding of the DNA double helix in chromatin-like structures from simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1843-1847.
- Giaever, G.N., Snyder, L., and Wang, J.C. (1988). DNA supercoiling in vivo. *Biophys Chem* 29, 7-15.
- Giaever, G.N., and Wang, J.C. (1988). Supercoiling of intracellular DNA can occur in eukaryotic cells. *Cell* 55, 849-856.

- Gilbert, D.M. (2004). In search of the holy replicator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 848-855.
- Gilson, E., and Geli, V. (2007). How telomeres are replicated. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 825-838.
- Goodwin, A., Wang, S.W., Toda, T., Norbury, C., and Hickson, I.D. (1999). Topoisomerase III is essential for accurate nuclear division in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* 27, 4050-4058.
- Goto, T., and Wang, J.C. (1985). Cloning of yeast TOP1, the gene encoding DNA topoisomerase I, and construction of mutants defective in both DNA topoisomerase I and DNA topoisomerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7178-7182.
- Greenfeder, S.A., and Newlon, C.S. (1992). Replication forks pause at yeast centromeres. *Mol Cell Biol* 12, 4056-4066.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hande, K.R. (1998). Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta* 1400, 173-184.
- Harmon, F.G., Brockman, J.P., and Kowalczykowski, S.C. (2003). RecQ helicase stimulates both DNA catenation and changes in DNA topology by topoisomerase III. *J Biol Chem* 278, 42668-42678.
- Harmon, F.G., DiGate, R.J., and Kowalczykowski, S.C. (1999). RecQ helicase and topoisomerase III comprise a novel DNA strand passage function: a conserved mechanism for control of DNA recombination. *Mol Cell* 3, 611-620.
- Hernandez, P., Martin-Parras, L., Martinez-Robles, M.L., and Schwartzman, J.B. (1993). Conserved features in the mode of replication of eukaryotic ribosomal RNA genes. *EMBO J* 12, 1475-1485.
- Hiasa, H., DiGate, R.J., and Marians, K.J. (1994). Decatenating activity of *Escherichia coli* DNA gyrase and topoisomerases I and III during *oriC* and pBR322 DNA replication in vitro. *J Biol Chem* 269, 2093-2099.
- Hiasa, H., and Marians, K.J. (1996). Two distinct modes of strand unlinking during theta-type DNA replication. *J Biol Chem* 271, 21529-21535.
- Hill, T.M. (1992). Arrest of bacterial DNA replication. *Annu Rev Microbiol* 46, 603-633.

Hoffman, C.S., and Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57, 267-272.

Holm, C., Goto, T., Wang, J.C., and Botstein, D. (1985). DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast. *Cell* 41, 553-563.

Huang, T.-W., Hsu, C.-C., Yang, H.-Y., and Chen, C.W. (2013). Topoisomerase IV is required for partitioning of circular chromosomes but not linear chromosomes in *Streptomyces*. *Nucleic Acids Research* 41, 10403-10413.

Huang, W.M. (1994). Type II DNA topoisomerase genes. *Adv Pharmacol* 29A, 201-225.

Huberman, J.A., Spotila, L.D., Nawotka, K.A., el-Assouli, S.M., and Davis, L.R. (1987). The in vivo replication origin of the yeast 2 microns plasmid. *Cell* 51, 473-481.

Hudson, B., and Vinograd, J. (1967). Catenated circular DNA molecules in HeLa cell mitochondria. *Nature* 216, 647-652.

Ishii, S., Murakami, T., and Shishido, K. (1991). Gyrase inhibitors increase the content of knotted DNA species of plasmid pBR322 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 173, 5551-5553.

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153, 163-168.

Ivessa, A.S., Zhou, J.Q., Schulz, V.P., Monson, E.K., and Zakian, V.A. (2002). *Saccharomyces* Rrm3p, a 5' to 3' DNA helicase that promotes replication fork progression through telomeric and subtelomeric DNA. *Genes Dev* 16, 1383-1396.

Ivessa, A.S., Zhou, J.Q., and Zakian, V.A. (2000). The *Saccharomyces* Pif1p DNA helicase and the highly related Rrm3p have opposite effects on replication fork progression in ribosomal DNA. *Cell* 100, 479-489.

Joshi, R.S., Pina, B., and Roca, J. (2010). Positional dependence of transcriptional inhibition by DNA torsional stress in yeast chromosomes. *EMBO J* 29, 740-748.

Kathiravan, M.K., Khilare, M.M., Nikoomanesh, K., Chothe, A.S., and Jain, K.S. (2013). Topoisomerase as target for antibacterial and anticancer drug discovery. *J Enzyme Inhib Med Chem* 28, 419-435.

Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Hiraga, S., and Suzuki, H. (1990). New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell* 63, 393-404.

- Kato, J., Nishimura, Y., Yamada, M., Suzuki, H., and Hirota, Y. (1988). Gene organization in the region containing a new gene involved in chromosome partition in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 170, 3967-3977.
- Kegel, A., Betts-Lindroos, H., Kanno, T., Jeppsson, K., Strom, L., Katou, Y., Itoh, T., Shirahige, K., and Sjogren, C. (2011). Chromosome length influences replication-induced topological stress. *Nature* 471, 392-396.
- Khodursky, A.B., Zechiedrich, E.L., and Cozzarelli, N.R. (1995). Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11801-11805.
- Kim, R.A., and Wang, J.C. (1989). Function of DNA topoisomerases as replication swivels in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 208, 257-267.
- Kim, R.A., and Wang, J.C. (1992). Identification of the yeast TOP3 gene product as a single strand-specific DNA topoisomerase. *J Biol Chem* 267, 17178-17185.
- Klevan, L., and Wang, J.C. (1980). Deoxyribonucleic acid gyrase-deoxyribonucleic acid complex containing 140 base pairs of deoxyribonucleic acid and an alpha 2 beta 2 protein core. *Biochemistry* 19, 5229-5234.
- Kobayashi, T. (2003). The replication fork barrier site forms a unique structure with Fob1p and inhibits the replication fork. *Mol Cell Biol* 23, 9178-9188.
- Kobayashi, T., Hidaka, M., and Horiuchi, T. (1989). Evidence of a ter specific binding protein essential for the termination reaction of DNA replication in *Escherichia coli*. *EMBO J* 8, 2435-2441.
- Kobayashi, T., and Horiuchi, T. (1996). A yeast gene product, Fob1 protein, required for both replication fork blocking and recombinational hotspot activities. *Genes Cells* 1, 465-474.
- Kornberg, A., and Baker, T.A. (1992). DNA replication (2nd Edition, New York: WH Freeman and Company (Republished by University Science Press, 2005)).
- Kornberg, R.D., and Lorch, Y. (1992). Chromatin structure and transcription. *Annu Rev Cell Biol* 8, 563-587.
- Koshland, D., Rutledge, L., Fitzgerald-Hayes, M., and Hartwell, L.H. (1987). A genetic analysis of dicentric minichromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 48, 801-812.

Krasnow, M.A., Stasiak, A., Spengler, S.J., Dean, F., Koller, T., and Cozzarelli, N.R. (1983). Determination of the absolute handedness of knots and catenanes of DNA. *Nature* 304, 559-560.

Kurth, I., and Gautier, J. (2010). Origin-dependent initiation of DNA replication within telomeric sequences. *Nucleic Acids Res* 38, 467-476.

Labib, K., Diffley, J.F., and Kearsey, S.E. (1999). G1-phase and B-type cyclins exclude the DNA-replication factor Mcm4 from the nucleus. *Nat Cell Biol* 1, 415-422.

Laurie, B., Katritch, V., Sogo, J., Koller, T., Dubochet, J., and Stasiak, A. (1998). Geometry and physics of catenanes applied to the study of DNA replication. *Biophys J* 74, 2815-2822.

Levine, C., Hiasa, H., and Marians, K.J. (1998). DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Biochim Biophys Acta* 1400, 29-43.

Lewin, B. (2000). *Genes VII* (New York: Oxford University Press).

Linskens, M.H., and Huberman, J.A. (1988). Organization of replication of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 8, 4927-4935.

Little, R.D., Platt, T.H., and Schildkraut, C.L. (1993). Initiation and termination of DNA replication in human rRNA genes. *Mol Cell Biol* 13, 6600-6613.

Liu, L.F., Davis, J.L., and Calendar, R. (1981a). Novel topologically knotted DNA from bacteriophage P4 capsids: studies with DNA topoisomerases. *Nucleic Acids Res* 9, 3979-3989.

Liu, L.F., Depew, R.E., and Wang, J.C. (1976). Knotted single-stranded DNA rings: a novel topological isomer of circular single-stranded DNA formed by treatment with *Escherichia coli* omega protein. *J Mol Biol* 106, 439-452.

Liu, L.F., Perkocha, L., Calendar, R., and Wang, J.C. (1981b). Knotted DNA from bacteriophage capsids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 5498-5502.

Liu, L.F., and Wang, J.C. (1987). Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7024-7027.

Lopez-Estraño, C., Schwartzman, J.B., Krimer, D.B., and Hernandez, P. (1998). Co-localization of polar replication fork barriers and rRNA transcription terminators in mouse rDNA. *J Mol Biol* 277, 249-256.

- Lopez, V., Martinez-Robles, M.L., Hernandez, P., Krimer, D.B., and Schwartzman, J.B. (2012). Topo IV is the topoisomerase that knots and unknots sister duplexes during DNA replication. *Nucleic Acids Res* 40, 3563-3573.
- Lucas, I., Germe, T., Chevrier-Miller, M., and Hyrien, O. (2001). Topoisomerase II can unlink replicating DNA by precatenane removal. *EMBO J* 20, 6509-6519.
- Lucchini, R., Wellinger, R.E., and Sogo, J.M. (2001). Nucleosome positioning at the replication fork. *EMBO J* 20, 7294-7302.
- Ma, J., and Wang, M. (2014). Interplay between DNA supercoiling and transcription elongation. *Transcription* 5, e28636.
- Maftahi, M., Han, C.S., Langston, L.D., Hope, J.C., Zigouras, N., and Freyer, G.A. (1999). The top3(+) gene is essential in *Schizosaccharomyces pombe* and the lethality associated with its loss is caused by Rad12 helicase activity. *Nucleic Acids Res* 27, 4715-4724.
- Makovets, S., Herskowitz, I., and Blackburn, E.H. (2004). Anatomy and dynamics of DNA replication fork movement in yeast telomeric regions. *Mol Cell Biol* 24, 4019-4031.
- Mann, C., and Davis, R.W. (1986). Structure and sequence of the centromeric DNA of chromosome 4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 6, 241-245.
- Marchuk, D., and Collins, F.S. (1988). pYAC-RC, a yeast artificial chromosome vector for cloning DNA cut with infrequently cutting restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res* 16, 7743.
- Marians, K.J. (1992). Prokaryotic DNA replication. *Annu Rev Biochem* 61, 673-719.
- Marians, K.J., Minden, J.S., and Parada, C. (1986). Replication of superhelical DNAs in vitro. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 33, 111-140.
- Marko, J.F. (1999). Coupling of intramolecular and intermolecular linkage complexity of two DNAs. *Physical Review E* 59, 900-912.
- Marko, J.F., and Siggia, E.D. (1994). Bending and twisting elasticity of DNA. *Macromolecules* 27, 981-988.
- Marsden, M.P., and Laemmli, U.K. (1979). Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell* 17, 849-858.

Martin-Parras, L., Hernandez, P., Martinez-Robles, M.L., and Schvartzman, J.B. (1991). Unidirectional replication as visualized by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *J Mol Biol* 220, 843-853.

Martin-Parras, L., Hernandez, P., Martinez-Robles, M.L., and Schvartzman, J.B. (1992). Initiation of DNA replication in ColE1 plasmids containing multiple potential origins of replication. *J Biol Chem* 267, 22496-22505.

Martin-Parras, L., Lucas, I., Martinez-Robles, M.L., Hernandez, P., Krimer, D.B., Hyrien, O., and Schvartzman, J.B. (1998). Topological complexity of different populations of pBR322 as visualized by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 26, 3424-3432.

Martinez-Robles, M.L., Witz, G., Hernandez, P., Schvartzman, J.B., Stasiak, A., and Krimer, D.B. (2009). Interplay of DNA supercoiling and catenation during the segregation of sister duplexes. *Nucleic Acids Res* 37, 5126-5137.

Mayan-Santos, M.D., Martinez-Robles, M.L., Hernandez, P., Krimer, D., and Schvartzman, J.B. (2007). DNA is more negatively supercoiled in bacterial plasmids than in minichromosomes isolated from budding yeast. *Electrophoresis* 28, 3845-3853.

Mayan-Santos, M.D., Martinez-Robles, M.L., Hernandez, P., Schvartzman, J.B., and Krimer, D.B. (2008). A redundancy of processes that cause replication fork stalling enhances recombination at two distinct sites in yeast rDNA. *Mol Microbiol* 69, 361-375.

McGlynn, P., Savery, N.J., and Dillingham, M.S. (2012). The conflict between DNA replication and transcription. *Mol Microbiol* 85, 12-20.

Meluh, P.B., Yang, P., Glowczewski, L., Koshland, D., and Smith, M.M. (1998). Cse4p is a component of the core centromere of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 94, 607-613.

Miller, K.M., Rog, O., and Cooper, J.P. (2006). Semi-conservative DNA replication through telomeres requires Taz1. *Nature* 440, 824-828.

Mirambeau, G., Duguet, M., and Forterre, P. (1984). ATP-dependent DNA topoisomerase from the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. Relaxation of supercoiled DNA at high temperature. *J Mol Biol* 179, 559-563.

Mizuuchi, K., Gellert, M., and Nash, H.A. (1978). Involvement of supertwisted DNA in integrative recombination of bacteriophage lambda. *J Mol Biol* 121, 375-392.

- Mizuuchi, K., Gellert, M., Weisberg, R.A., and Nash, H.A. (1980). Catenation and supercoiling in the products of bacteriophage lambda integrative recombination in vitro. *J Mol Biol* 141, 485-494.
- Murray, A.W., Schultes, N.P., and Szostak, J.W. (1986). Chromosome length controls mitotic chromosome segregation in yeast. *Cell* 45, 529-536.
- Murray, A.W., and Szostak, J.W. (1983). Construction of artificial chromosomes in yeast. *Nature* 305, 189-193.
- Nitiss, J.L. (1998). Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta* 1400, 63-81.
- Nurse, P., Levine, C., Hassing, H., and Marians, K.J. (2003). Topoisomerase III can serve as the cellular decatenase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 278, 8653-8660.
- Olavarrieta, L., Hernandez, P., Krimer, D.B., and Schwartzman, J.B. (2002a). DNA knotting caused by head-on collision of transcription and replication. *J Mol Biol* 322, 1-6.
- Olavarrieta, L., Martinez-Robles, M.L., Hernandez, P., Krimer, D.B., and Schwartzman, J.B. (2002b). Knotting dynamics during DNA replication. *Mol Microbiol* 46, 699-707.
- Olavarrieta, L., Martinez-Robles, M.L., Sogo, J.M., Stasiak, A., Hernandez, P., Krimer, D.B., and Schwartzman, J.B. (2002c). Supercoiling, knotting and replication fork reversal in partially replicated plasmids. *Nucleic Acids Res* 30, 656-666.
- Palladino, F., Laroche, T., Gilson, E., Axelrod, A., Pillus, L., and Gasser, S.M. (1993). SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres. *Cell* 75, 543-555.
- Panzeri, L., and Philippsen, P. (1982). Centromeric DNA from chromosome VI in *Saccharomyces cerevisiae* strains. *EMBO J* 1, 1605-1611.
- Peirson, S.N., Butler, J.N., and Foster, R.G. (2003). Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res* 31, e73.
- Peng, H., and Marians, K.J. (1993). *Escherichia coli* topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. *J Biol Chem* 268, 24481-24490.
- Peter, B.J., Ullsperger, C., Hiasa, H., Marians, K.J., and Cozzarelli, N.R. (1998). The structure of supercoiled intermediates in DNA replication. *Cell* 94, 819-827.

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.

Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30, e36.

Plank, J.L., Wu, J., and Hsieh, T.S. (2006). Topoisomerase III α and Bloom's helicase can resolve a mobile double Holliday junction substrate through convergent branch migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11118-11123.

Pommier, Y., Pourquier, P., Fan, Y., and Strumberg, D. (1998). Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1400, 83-105.

Portugal, J., and Rodriguez-Campos, A. (1996). T7 RNA polymerase cannot transcribe through a highly knotted DNA template. *Nucleic Acids Res* 24, 4890-4894.

Postow, L., Hardy, C.D., Arsuaga, J., and Cozzarelli, N.R. (2004). Topological domain structure of the Escherichia coli chromosome. *Genes Dev* 18, 1766-1779.

Postow, L., Peter, B.J., and Cozzarelli, N.R. (1999). Knot what we thought before: the twisted story of replication. *Bioessays* 21, 805-808.

Postow, L., Ullsperger, C., Keller, R.W., Bustamante, C., Vologodskii, A.V., and Cozzarelli, N.R. (2001). Positive torsional strain causes the formation of a four-way junction at replication forks. *J Biol Chem* 276, 2790-2796.

Prado, F., and Aguilera, A. (2005). Impairment of replication fork progression mediates RNA polIII transcription-associated recombination. *EMBO J* 24, 1267-1276.

Pruyne, D., and Bretscher, A. (2000). Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. *J Cell Sci* 113 (Pt 3), 365-375.

Roca, J., and Wang, J.C. (1994). DNA transport by a type II DNA topoisomerase: evidence in favor of a two-gate mechanism. *Cell* 77, 609-616.

Santamaria, D., de la Cueva, G., Martinez-Robles, M.L., Krimer, D.B., Hernandez, P., and Schvartzman, J.B. (1998). DnaB helicase is unable to dissociate RNA-DNA hybrids. Its implication in the polar pausing of replication forks at ColE1 origins. *J Biol Chem* 273, 33386-33396.

- Santamaria, D., Hernandez, P., Martinez-Robles, M.L., Krimer, D.B., and Schvartzman, J.B. (2000a). Premature termination of DNA replication in plasmids carrying two inversely oriented ColE1 origins. *J Mol Biol* 300, 75-82.
- Santamaria, D., Viguera, E., Martinez-Robles, M.L., Hyrien, O., Hernandez, P., Krimer, D.B., and Schvartzman, J.B. (2000b). Bi-directional replication and random termination. *Nucleic Acids Res* 28, 2099-2107.
- Schiessel, H., Widom, J., Bruinsma, R.F., and Gelbart, W.M. (2001). Polymer reptation and nucleosome repositioning. *Phys Rev Lett* 86, 4414-4417.
- Schvartzman, J.B., Adolph, S., Martin-Parras, L., and Schildkraut, C.L. (1990). Evidence that replication initiates at only some of the potential origins in each oligomeric form of bovine papillomavirus type 1 DNA. *Mol Cell Biol* 10, 3078-3086.
- Schvartzman, J.B., Martinez-Robles, M.L., Hernandez, P., and Krimer, D.B. (2013a). The benefit of DNA supercoiling during replication. *Biochem Soc Trans* 41, 646-651.
- Schvartzman, J.B., Martinez-Robles, M.L., Hernandez, P., and Krimer, D.B. (2013b). Plasmid DNA topology assayed by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Methods Mol Biol* 1054, 121-132.
- Schvartzman, J.B., Martinez-Robles, M.L., Lopez, V., Hernandez, P., and Krimer, D.B. (2012). 2D gels and their third-dimension potential. *Methods*.
- Schvartzman, J.B., and Stasiak, A. (2004). A topological view of the replicon. *EMBO Rep* 5, 256-261.
- Seki, M., Nakagawa, T., Seki, T., Kato, G., Tada, S., Takahashi, Y., Yoshimura, A., Kobayashi, T., Aoki, A., Otsuki, M., *et al.* (2006). Bloom helicase and DNA topoisomerase III α are involved in the dissolution of sister chromatids. *Mol Cell Biol* 26, 6299-6307.
- Sfeir, A., Kosiyatrakul, S.T., Hockemeyer, D., MacRae, S.L., Karlseder, J., Schildkraut, C.L., and de Lange, T. (2009). Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell* 138, 90-103.
- Shampay, J., and Blackburn, E.H. (1989). Tetrahymena micronuclear sequences that function as telomeres in yeast. *Nucleic Acids Res* 17, 3247-3260.
- Shampay, J., Szostak, J.W., and Blackburn, E.H. (1984). DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* 310, 154-157.

Shishido, K., Ishii, S., and Komiyama, N. (1989). The presence of the region on pBR322 that encodes resistance to tetracycline is responsible for high levels of plasmid DNA knotting in *Escherichia coli* DNA topoisomerase I deletion mutant. *Nucleic Acids Res* 17, 9749-9759.

Shishido, K., Komiyama, N., and Ikawa, S. (1987). Increased production of a knotted form of plasmid pBR322 DNA in *Escherichia coli* DNA topoisomerase mutants. *J Mol Biol* 195, 215-218.

Sikorski, R.S., and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.

Sinden, R.R., and Pettijohn, D.E. (1981). Chromosomes in living *Escherichia coli* cells are segregated into domains of supercoiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 224-228.

Sogo, J.M., Stasiak, A., Martinez-Robles, M.L., Krimer, D.B., Hernandez, P., and Schwartzman, J.B. (1999). Formation of knots in partially replicated DNA molecules. *J Mol Biol* 286, 637-643.

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-517.

Spengler, S.J., Stasiak, A., and Cozzarelli, N.R. (1985). The stereostructure of knots and catenanes produced by phage lambda integrative recombination: implications for mechanism and DNA structure. *Cell* 42, 325-334.

Srivatsan, A., Tehranchi, A., MacAlpine, D.M., and Wang, J.D. (2010). Co-orientation of replication and transcription preserves genome integrity. *PLoS Genet* 6, e1000810.

Stasiak, A., and Di Capua, E. (1982). The helicity of DNA in complexes with recA protein. *Nature* 299, 185-186.

Stasiak, A., Di Capua, E., and Koller, T. (1981). Elongation of duplex DNA by recA protein. *J Mol Biol* 151, 557-564.

Stasiak, A., Katritch, V., Bednar, J., Michoud, D., and Dubochet, J. (1996). Electrophoretic mobility of DNA knots. *Nature* 384, 122.

Sundin, O., and Varshavsky, A. (1980). Terminal stages of SV40 DNA replication proceed via multiply intertwined catenated dimers. *Cell* 21, 103-114.

Sundin, O., and Varshavsky, A. (1981). Arrest of segregation leads to accumulation of highly intertwined catenated dimers: dissection of the final stages of SV40 DNA replication. *Cell* 25, 659-669.

Szostak, J.W. (2010). DNA ends: just the beginning (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 49, 7386-7404.

Szostak, J.W., and Blackburn, E.H. (1982). Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* 29, 245-255.

Tack, L.C., and Proctor, G.N. (1987). Two major replicating simian virus 40 chromosome classes. Synchronous replication fork movement is associated with bound large T antigen during elongation. *J Biol Chem* 262, 6339-6349.

Tanaka, S., and Diffley, J.F. (2002). Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase. *Nat Cell Biol* 4, 198-207.

Tapper, D.P., and DePamphilis, M.L. (1980). Preferred DNA sites are involved in the arrest and initiation of DNA synthesis during replication of SV40 DNA. *Cell* 22, 97-108.

Trigueros, S., Arsuaga, J., Vazquez, M.E., Summers, D.W., and Roca, J. (2001). Novel display of knotted DNA molecules by two-dimensional gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 29, E67-67.

Ullsperger, C., and Cozzarelli, N.R. (1996). Contrasting enzymatic activities of topoisomerase IV and DNA gyrase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 271, 31549-31555.

Ullsperger, C.J., Vologodskii, A.V., and Cozzarelli, N.R. (1995). Unlinking of DNA by Topoisomerases During DNA Replication. In *Nucleic Acids and Molecular Biology*, F. Eckstein, and D.J. Lilley, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 115-142.

Vaughn, J.P., Dijkwel, P.A., and Hamlin, J.L. (1990). Replication initiates in a broad zone in the amplified CHO dihydrofolate reductase domain. *Cell* 61, 1075-1087.

Vetcher, A.A., McEwen, A.E., Abujarour, R., Hanke, A., and Levene, S.D. (2010). Gel mobilities of linking-number topoisomers and their dependence on DNA helical repeat and elasticity. *Biophys Chem* 148, 104-111.

Viguera, E., Hernandez, P., Krimer, D.B., Boistov, A.S., Lurz, R., Alonso, J.C., and Schwartzman, J.B. (1996). The ColE1 unidirectional origin acts as a polar replication fork pausing site. *J Biol Chem* 271, 22414-22421.

Viguera, E., Rodriguez, A., Hernandez, P., Krimer, D.B., Trellez, O., and Schwartzman, J.B. (1998). A computer model for the analysis of DNA replication intermediates by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Gene* 217, 41-49.

Villwock, S.K., and Aparicio, O.M. (2014). Two-dimensional agarose gel electrophoresis for analysis of DNA replication. *Methods Mol Biol* 1205, 329-340.

Vinograd, J., Lebowitz, J., Radloff, R., Watson, R., and Laipis, P. (1965). The twisted circular form of polyoma viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 53, 1104-1111.

Vologodskii, A. (2010). DNA supercoiling helps to unlink sister duplexes after replication. *Bioessays* 32, 9-12.

Vologodskii, A.V., and Cozzarelli, N.R. (1994). Conformational and thermodynamic properties of supercoiled DNA. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23, 609-643.

Vologodskii, A.V., Crisona, N.J., Laurie, B., Pieranski, P., Katritch, V., Dubochet, J., and Stasiak, A. (1998). Sedimentation and electrophoretic migration of DNA knots and catenanes. *J Mol Biol* 278, 1-3.

Wallis, J.W., Chrebet, G., Brodsky, G., Rolfe, M., and Rothstein, R. (1989). A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell* 58, 409-419.

Wang, J.C. (1971). Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein omega. *J Mol Biol* 55, 523-533.

Wang, J.C. (1996). DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 65, 635-692.

Wang, J.C. (1998). Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Q Rev Biophys* 31, 107-144.

Wang, J.C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 430-440.

Wang, J.D., Berkmen, M.B., and Grossman, A.D. (2007). Genome-wide coorientation of replication and transcription reduces adverse effects on replication in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5608-5613.

Ward, T.R., Hoang, M.L., Prusty, R., Lau, C.K., Keil, R.L., Fangman, W.L., and Brewer, B.J. (2000). Ribosomal DNA replication fork barrier and HOT1 recombination hot spot: shared sequences but independent activities. *Mol Cell Biol* 20, 4948-4957.

- Wasserman, S.A., and Cozzarelli, N.R. (1985). Determination of the stereostructure of the product of Tn3 resolvase by a general method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 1079-1083.
- Wasserman, S.A., Dungan, J.M., and Cozzarelli, N.R. (1985). Discovery of a predicted DNA knot substantiates a model for site-specific recombination. *Science* 229, 171-174.
- Watson, J.D., and Crick, F.H. (1953a). Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171, 964-967.
- Watson, J.D., and Crick, F.H. (1953b). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-738.
- Weber, C., Carlen, M., Dietler, G., Rawdon, E.J., and Stasiak, A. (2013). Sedimentation of macroscopic rigid knots and its relation to gel electrophoretic mobility of DNA knots. *Sci Rep* 3, 1091.
- Weber, C., De Los Rios, P., Dietler, G., and Stasiak, A. (2006a). Simulations of electrophoretic collisions of DNA knots with gel obstacles. *J Phys: Condens Matter* 18, S161-171.
- Weber, C., Stasiak, A., De Los Rios, P., and Dietler, G. (2006b). Numerical simulation of gel electrophoresis of DNA knots in weak and strong electric fields. *Biophys J* 90, 3100-3105.
- Weber, C., Stasiak, A., Fleurant, M., De Los Rios, P., and Dietler, G. (2005). Gel electrophoresis of DNA knots in weak and strong electric fields. *Archives of Physics*, arXiv:physics/0503097.
- White, J.H., Millett, K.C., and Cozzarelli, N.R. (1987). Description of the topological entanglement of DNA catenanes and knots by a powerful method involving strand passage and recombination. *J Mol Biol* 197, 585-603.
- Wiesendanger, B., Lucchini, R., Koller, T., and Sogo, J.M. (1994). Replication fork barriers in the *Xenopus* rDNA. *Nucleic Acids Res* 22, 5038-5046.
- Williamson, J.R. (1994). G-quartet structures in telomeric DNA. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23, 703-730.
- Witz, G., Dietler, G., and Stasiak, A. (2011a). DNA knots and DNA supercoiling. *Cell Cycle* 10.

Witz, G., Dietler, G., and Stasiak, A. (2011b). Tightening of DNA knots by supercoiling facilitates their unknotting by type II DNA topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 3608-3611.

Witz, G., and Stasiak, A. (2010). DNA supercoiling and its role in DNA decatenation and unknotting. *Nucleic Acids Res* 38, 2119-2133.

Worcel, A., and Burgi, E. (1972). On the structure of the folded chromosome of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 71, 127-147.

Wu, H.Y., Shyy, S.H., Wang, J.C., and Liu, L.F. (1988). Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell* 53, 433-440.

Yamaguchi, H., Kubota, K., and Harada, A. (2000). Direct observation of DNA catenanes by atomic force microscopy. *Chem Lett* 29, 384-385.

Zechiedrich, E.L., and Cozzarelli, N.R. (1995). Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 9, 2859-2869.

Zechiedrich, E.L., Khodursky, A.B., Bachellier, S., Schneider, R., Chen, D., Lilley, D.M., and Cozzarelli, N.R. (2000). Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 275, 8103-8113.

Zechiedrich, E.L., Khodursky, A.B., and Cozzarelli, N.R. (1997). Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 11, 2580-2592.

Zhu, J., Newlon, C.S., and Huberman, J.A. (1992). Localization of a DNA replication origin and termination zone on chromosome III of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 12, 4733-4741.

Zivanovic, Y., Goulet, I., and Prunell, A. (1986). Properties of supercoiled DNA in gel electrophoresis. The V-like dependence of mobility on topological constraint. DNA-matrix interactions. *J Mol Biol* 192, 645-660.

8. MATERIAL SUPLEMENTARIO

TABLAS

Se indica la movilidad electroforética de las señales de cada familia de topoisómeros detectadas en las inmunodetecciones de las Figuras 20 y 23 expresada en mm/h. Las condiciones de electroforesis se indican encima de cada tabla.

Tabla 1. Datos de las inmunodetecciones de la Figura 20.

1ª Dimensión: 0,4% - 1,0 V/cm

ΔC	CatAs_F20A	Scds_F20A	Scds_F20B	Knds_F20B
0		3,28	2,92	2,92
1	3,70	3,38	3,02	
2	3,90	3,46	3,10	
3	4,08	3,54	3,18	3,16
4	4,26	3,64	3,28	3,26
5	4,40	3,74	3,38	3,34
6	4,52	3,84	3,48	3,44
7	4,64	3,94	3,58	3,54
8	4,74	4,04	3,70	3,62
9	4,84	4,12	3,78	3,72
10	4,90	4,20	3,86	3,82
11	4,98	4,28	3,94	3,92
12	5,06	4,34	4,00	4,02
13	5,10	4,40	4,06	4,08
14	5,16	4,46	4,12	
15	5,20	4,48	4,16	
16	5,26	4,54	4,20	
17		4,58	4,24	
18		4,62	4,28	
19			4,30	
20			4,32	

Tabla 2. Datos de las inmunodetecciones de la Figura 20.**2ª Dimensión: 1,0% - 5,0 V/cm**

ΔC	CatAs_F20A	Scds_F20A	Scds_F20B	Knds_F20B
0		5,50	5,00	5,00
1	2,25	5,50	5,00	
2	1,95	5,50	5,00	
3	2,10	5,50	5,03	3,38
4	2,45	5,50	5,06	2,78
5	2,95	5,60	5,22	2,41
6	3,55	5,65	5,41	2,22
7	4,15	5,80	5,59	2,25
8	4,75	5,90	5,78	2,41
9	5,35	6,15	6,06	2,53
10	6,00	6,35	6,31	2,78
11	6,60	6,60	6,59	3,00
12	7,15	6,90	6,91	
13	7,65	7,15	7,19	
14	8,20	7,40	7,47	
15	8,65	7,65	7,78	
16	9,00	7,90	8,03	
17		8,15	8,19	
18		8,35	8,63	
19			8,91	

Tabla 3. Datos de las inmunodetecciones de la Figura 20.**2ª Dimensión: 1,0% - 5,8 V/cm**

ΔC	CatAs_F20A	Scds_F20A	Scds_F20B	Knds_F20B
0		10,55	9,49	9,49
1	4,59	10,55	9,49	
2	4,05	10,59	9,49	
3	4,36	10,64	9,49	6,11
4	5,00	10,64	9,49	4,55
5	5,90	10,64	9,49	3,64
6	6,90	10,68	9,49	3,25
7	7,86	10,68	9,63	3,06
8	8,77	10,73	9,75	2,99
9	9,64	10,77	10,01	3,12
10	10,36	10,91	10,40	3,38
11	11,09	11,14	10,66	3,64
12		11,41	11,05	4,03
13		11,73	11,44	4,55
14		12,14	11,96	4,94
15		12,55	12,48	5,46
16		12,95	12,80	6,11
17		13,41	13,26	6,50
18		13,86	13,71	
19		14,27	14,17	
20		14,72	14,56	

Tabla 4. Datos de las inmunodetecciones de la Figura 20.**2ª Dimensión: 1,0% - 6,6 V/cm**

ΔC	CatAs_F20A	Scds_F20A	Scds_F20B	Knds_F20B
0		14,19	14,09	14,09
1	6,38	14,19	14,09	
2	5,13	14,25	14,16	
3	5,25	14,38	14,23	9,74
4	5,75	14,44	14,31	7,74
5	6,69	14,50	14,38	6,49
6	7,63	14,56	14,38	5,53
7	8,75	14,69	14,46	5,02
8	10,00	14,75	14,53	4,79
9	11,25	14,81	14,53	4,87
10	12,50	14,88	14,60	5,09
11	13,63	14,94	14,68	5,38
12	14,63	15,00	14,75	
13	15,63	15,06	14,90	
14	16,38		15,19	
15			15,64	
16			15,93	

Tabla 5. Datos de las inmunodetecciones de la Figura 23.**2ª Dimensión: 0,8% - 5,0 V/cm**

ΔC	CatAs_F23A	Scds_F23A	Scds_F23B	Knds_F23B
0		9,40	9,25	9,25
1	5,60	9,40	9,25	
2	5,40	9,40	9,25	
3	5,85	9,50	9,45	7,40
4	6,55	9,40	9,65	6,50
5	7,30	9,50	9,75	6,00
6	8,00	9,65	10,0	5,75
7	8,40	9,80	10,25	5,65
8	8,80	10,10	10,55	5,75
9	9,60	10,40	10,80	5,95
10	10,30	10,60	11,10	6,25
11	10,90	10,90	11,40	6,55
12		11,15	11,70	6,95
13		11,50	11,95	7,30
14		11,80	12,10	
15		12,05	12,40	
16			12,70	

Tabla 6. Datos de las inmunodetecciones de la Figura 23.**2ª Dimensión: 1,2% - 5,0 V/cm**

ΔC	CatAs_F23A	Scds_F23A	Scds_F23B	Knds_F23B
0		3,02	2,59	2,59
1	0,64	3,02	2,59	
2	0,45	3,02	2,59	
3	0,57	3,05	2,59	1,45
4	0,68	3,11	2,61	1,02
5	0,95	3,18	2,64	0,82
6	1,27	3,27	2,75	0,68
7	1,68	3,41	2,86	0,61
8	2,09	3,59	2,98	0,64
9	2,50	3,77	3,14	0,66
10	2,95	3,95	3,30	0,70
11	3,41	4,34	3,48	0,80
12	3,86	4,73	3,64	0,91
13		4,91	3,82	1,05
14		5,59	4,00	1,18
15			4,18	1,36
16			4,36	1,50
17			4,55	1,68
18			4,73	
19			4,91	
20			5,05	

9. PUBLICACIONES

